

Université de Montréal

Caractérisation de l'oncogène MLF1 (Myeloid Leukemia Factor 1)

Par

Vincent Bourgoin

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en Biologie Moléculaire

Août, 2005

©, Vincent Bourgoin, 2005



QH

506

U54

2006

V. 011

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation de l'oncogène MLF1 (Myeloid Leukemia Factor 1)

présenté par :  
Vincent Bourgoin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Anne-Marie Mes-Masson  
président-rapporteur

Dr Eric Milot  
directeur de recherche

Dr François Boudreau  
membre du jury

## Résumé en français

Le syndrome de myélodysplasie (MDS) est caractérisé par une différenciation et une prolifération anormale des cellules hématopoïétiques. Le gène « myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1 » (MLF1) est anormalement régulé dans plusieurs cas de MDS et d'AML (leucémie myéloïde aiguë). La surexpression de MLF1 peut bloquer la différenciation des cellules hématopoïétiques et induire une production de cellules myéloïdes aux dépens de la voie érythroïde. MLF1 et son homologue murin Mlfl ont une homologie de 86%. Ils sont localisés principalement au cytoplasme dû à leur liaison aux protéines de la famille 14-3-3, mais la présence dans le noyau de Mlfl sous forme de foci a aussi été rapportée. Par la surexpression de Mlfl nous voulons donc déterminer sa fonction et son influence sur les processus cellulaires lors de l'hématopoïèse. Différentes constructions contenant le gène Mlfl ont été réalisées et transfectées dans des cellules souches embryonnaires (ES) et COS-7. Nous avons observé que Mlfl se retrouve dans le cytoplasme sous forme de foci et également au niveau de la région péri-nucléaire, mais ne s'accumule pas dans le noyau. De plus, nos études avec la protéine de fusion Mlfl-GFP, nous permettent de renforcer l'idée que Mlfl pourrait jouer un rôle spécifique lors du cycle cellulaire. En effet, dans des clones de cellules ES, une augmentation de Mlfl dans la phase G2-M a été observée. De plus, les clones ES/Mlfl-GFP expriment faiblement le transgène (8-15%) par rapport aux contrôles ES/EGFP (60-90%), possiblement à cause d'une dégradation rapide de Mlfl aux protéasomes. Cette étude nous permettra de mieux comprendre l'implication de MLF1 durant l'hématopoïèse et éventuellement permettre de développer des thérapies pour traiter les patients atteints de MDS et d'AML associés à une régulation anormale de MLF1.

**Mots clés :** Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1, MLF1, syndrome de myélodysplasie, leucémie myéloïde aiguë, apoptose, cycle cellulaire, cellule souche embryonnaire

## Résumé en anglais

The myelodysplastic syndrome (MDS) is characterized by an abnormal differentiation and proliferation of hematopoietic cells. Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1 (MLF1) gene dysregulation is observed in different cases of MDS and AML (acute myeloid leukemia). MLF1 can block hematopoietic cell differentiation and is able to induce the production of myeloid cells instead of erythroid cells. Due to its interaction with 14-3-3 proteins, MLF1 and its murine homolog Mlfl, are mainly found in the cytoplasm, but nuclear foci of Mlfl have also been reported. Through the over-expression of Mlfl, our aim is to elucidate the function of Mlfl as well as its influence on cellular processes during hematopoiesis. Mlfl has been cloned in different expression vectors and transfected in COS-7 and embryonic stems (ES) cells. Our observations demonstrate that Mlfl localizes to the cytoplasm, where it forms foci, as well as to the peri-nuclear region. However, we don't see the accumulation of Mlfl in the nucleus. The Mlfl-GFP fusion protein allows us to reinforce the idea that Mlfl plays a specific role during the cell cycle. Indeed, in ES cell clones, an increase of Mlfl was observed in the G2-M phase. Moreover, ES/Mlfl-GFP clones showed a low expression of the transgene (8-15%), compared to the control clones ES/EGFP (60-90%). This may be due to a rapid degradation of Mlfl through the proteasome. Therefore, this study should improve our understanding of MLF1 function during hematopoiesis. Eventually, therapies could be developed to treat patients suffering from MDS and AML characterized by the abnormal regulation of MLF1.

**Key words:** Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1, MLF1, myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, apoptosis, cell cycle, embryonic stem cell

## Table des matières

Résumé en français.....	iii
Résumé en anglais.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
1. Introduction.....	1
1.1 Hématopoïèse.....	2
1.2 Désordres sanguins.....	4
1.2.1 Le syndrome de myélodysplasie (MDS).....	6
1.2.2 La leucémie myéloïde aiguë (AML).....	7
1.3 MLF1.....	9
1.3.1 Nucléophosmine.....	9
1.3.2 NPM-MLF1.....	11
1.3.3 MLF1 humain.....	12
1.3.4 Homologue murin de MLF1 (Mlf1).....	14
1.3.5 Protéines 14-3-3.....	17
1.3.6 Madm.....	18
1.3.7 MLF1IP.....	19
1.3.8 p53.....	20
1.4 Les cellules souches embryonnaires (ES).....	20
1.5 Apoptose.....	21
1.6 Cycle cellulaire.....	24
1.7 Hypothèse de recherche et objectifs.....	25
2. Matériel et méthodes.....	26
2.1 Clonage.....	27
2.2 Mutagenèse dirigée.....	27
2.3 Cultures cellulaires et transfections.....	27
2.3.1 Cellules COS-7.....	27

2.3.2 Cellules R1-ES .....	28
2.4 Microscopie .....	29
2.4.1 Immunofluorescence indirecte .....	29
2.4.2 Fluorescence directe (GFP) .....	29
2.5 Extraction d'ARN.....	29
2.6 Transfert de type northern .....	30
2.7 RT-PCR.....	30
2.8 Transfert de type western .....	31
2.9 Cytométrie en flux.....	31
2.9.1 Phénotype .....	31
2.9.2 Tri cellulaire .....	31
2.9.3 Cycle cellulaire.....	32
2.10 Traitement à la clasto-lactacystine $\beta$ -lactone .....	32
3. Résultats .....	34
3.1 Établissement d'un modèle cellulaire fonctionnel .....	35
3.1.1 Transfection stable de cellules R1-ES avec pEGFPN1/Mif1 .....	35
3.1.2 Clonage moléculaire de Mif1 .....	37
3.1.2.1 Mutagenèse sur pcDNA3.1B/Mif1-V5-His .....	38
3.1.3 Transfection de cellules COS-7 avec pcDNA3.1B/Mif1-V5-His .....	41
3.1.4 Transfection stable de cellules R1-ES avec pcDNA3.1B/Mif1-V5-His et pCEP4/Bcl-X <sub>L</sub> .....	42
3.1.5 Mutagenèse pour obtenir la protéine de fusion Mif1-GFP.....	44
3.1.6 Transfection stable de cellules R1-ES avec pEGFPN1/Mif1-GFP .....	45
3.2 Étude et caractérisation des mécanismes moléculaires dans lesquels Mif1 est impliqué.....	49
3.2.1 Tri cellulaire sur le clone ES/Mif1-GFP #3 .....	49
3.2.2 Analyse du cycle cellulaire des clones ES/EGFP .....	50
3.2.3 Localisation cellulaire de Mif1 .....	53
3.2.4 Traitement des clones ES/Mif1-GFP avec un inhibiteur du protéasome ..	61
4. Discussion .....	63
4.1 L'établissement d'un modèle cellulaire .....	64



4.2 Mlf1 localise dans le cytoplasme des cellules ES et COS-7 .....	67
4.2.1 Localisation de Mlf1 suite aux mutagenèses sur pcDNA3.1B/Mlf1- V5-His.....	68
4.3 Expression en G2-M et dégradation aux protéasomes de Mlf1 .....	69
4.4 Mlf1/MLF1 et les différents modèles cellulaires .....	72
4.5 Conclusion.....	73
5. Références .....	74
Annexe I .....	88

## Liste des tableaux

Tableau I : Classification FAB des syndromes de myélodysplasie.....	6
Tableau II : Classification FAB des leucémies myéloïdes aiguës.....	8
Tableau III : Liste des amorces utilisées .....	33

## Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse définitive.....	2
Figure 2 : Représentation schématique de NPM, NPM-MLF1, MLF1 et Mlf1.....	11
Figure 3 : Les interactions et l'implication possible de Mlf1 dans différentes voies de signalisation cellulaires. ....	16
Figure 4 : Voies de l'apoptose.....	23
Figure 5 : Vecteurs d'expression contenant Mlf1 ou Bcl-XL.....	36
Figure 6 : Expression de Mlf1 dans les clones ES/Mlf1 non apoptotiques.....	37
Figure 7 : Localisation cellulaire de Mlf1 et des mutants Mlf1 dans les cellules COS-7. ....	40
Figure 8 : Caractérisation des clones ES/Mlf1-GFP et ES/EGFP.....	46
Figure 9 : Analyse en cytométrie en flux des clones ES/Mlf1-GFP et ES/EGFP.....	48
Figure 10 : Tris cellulaires sur le clone ES/Mlf1-GFP #3 et les variations du nombre de cellules GFP positives au cours du temps. ....	50
Figure 11 : Analyse du cycle cellulaire du clone ES/Mlf1-GFP #3 trié.....	51
Figure 12 : Localisation cellulaire de Mlf1-GFP dans les cellules R1-ES.....	54
Figure 13 : Localisation cellulaire de EGFP dans les cellules R1-ES.....	55
Figure 14 : Localisation cellulaire de Mlf1-V5-His dans les cellules R1-ES. ....	56
Figure 15 : Localisation cellulaire de EGFP et Mlf1-GFP dans les cellules COS-7..	57
Figure 16 : Localisation cellulaire de Mlf1-V5-His dans les cellules COS-7.....	59
Figure 17 : Localisation cellulaire de Mlf1-GFP dans le clone ES/Mlf1-GFP #13...	60
Figure 18 : Traitement avec la clasto-lactacystine $\beta$ -lactone des clones ES/EGFP et ES/Mlf1-GFP.....	62
Figure 19 : Modèle reliant une expression cycle cellulaire spécifique de Mlf1 avec sa dégradation au protéasome.....	71

## Liste des sigles et des abréviations

a.a. :	Acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AGM :	Aorte-gonade-mésonephros
ALL :	Leucémie lymphocytaire aiguë
AML :	Leucémie myéloïde aiguë
ARN :	Acide ribonucléique
BMP :	« bone morphogenic protein »
CDK :	« Cyclin-dependent kinase »
Cellules ES :	Cellules souches embryonnaires
CLL :	Leucémie lymphocytaire chronique
CML :	Leucémie myéloïde chronique
CMML :	Leucémie myélomonocytaire chronique
DMEM :	« Dulbecco's modified Eagle's medium »
DNaseI :	Désoxyribonucléase I
EB :	Corps embryonnaire
EGFP :	« Enhanced green fluorescent protein »
EKLF :	« Erythroid Krüppel-Like Factor »
EPO :	Érythropoïétine
Ex3 <sup>+</sup> :	Exon supplémentaire de Mlf1
FAB :	Franco-américano-britannique
FADD :	« Fas-associated death domain protein »
FBS :	Sérum de fœtus bovin
fc :	Forme courte
fl :	Forme longue
G418 :	Généticine
G-CSF :	« Granulocyte colony stimulating factor »
GM-CSF :	« Granulocyte-macrophage colony stimulating factor »

GTP :	Guanosine triphosphate
h :	Heure(s)
HS :	Site hypersensible
HSC :	Cellules souches hématopoïétiques
IL :	Interleukine
kb :	Kilo-paires de bases
LCR :	« Locus control region »
LIF :	« Leukemia Inhibitory Factor »
M :	Molaire
Madm :	« MLF1 adaptor molecule »
M-CSF :	« Macrophage colony stimulating factor »
MDS :	Syndrome de myélodysplasie
min :	Minute(s)
ml :	Millilitre(s)
MLF1 :	« Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1 » humain
Mlf1/HLS7 :	« Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1 » murin
mm :	Millimètre(s)
mM :	Millimolaire
NLS :	Signal de localisation nucléaire
NPM (B23) :	Nucléophosmine
P.M. :	Maqueur de poids moléculaire protéique
pb :	Paires de bases
PBS :	« Phosphate-buffered saline »
Ph1 :	Chromosome Philadelphie
PI :	Iodure de propidium
RA :	Anémie réfractaire
RAEB :	Anémie réfractaire avec excès de blastes
RAEB-t :	Anémie réfractaire avec excès de blastes en cours de transformation
RARS :	Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne
Rb :	Rétinoblastome

RT-PCR :	Réaction de transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase
SCF :	« Stem Cell Factor »
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
sec :	Seconde(s)
SMC :	« Structural maintenance of chromosomes »
SV40LT	« SV40 large T-antigen »
TNF :	« Tumor-necrosis factor »
TUNEL :	« Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling »
U :	Unité(s)
$\lambda$ :	Marqueur de poids moléculaire d'ADN
$\mu\text{F}$ :	MicroFaraday
$\mu\text{g}$ :	microgramme(s)
$\mu\text{l}$ :	Microlitre(s)
$\mu\text{M}$ :	Micromolaire

## Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de recherche Dr Eric Milot pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir confié ce projet de recherche. Merci spécialement à Dre Stefania Bottardi pour son aide sur tous les aspects de la recherche scientifique. Merci également à tous les membres du laboratoire : Julie Ross, entre autre pour la lecture de mon mémoire, et Natacha Pierre-Charles, ainsi qu'aux membres antérieurs : Caroline Valat, Silvana Lachance, Angélique Aumont, Alex Wollenshlaeger, Houssein Hajj Hassan et Antonia Balassy. Merci à Sophie Ouellet pour les tris cellulaires.

Je remercie mes parents Gilles Bourgoin et Ghislaine Desjardins ainsi que ma sœur Christine Bourgoin pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes études.

### **Contribution :**

Merci à Mélanie Marois pour sa contribution, lors de son stage d'été, au niveau de la construction et la caractérisation des mutants Mif1 $\Delta$ Ex3<sup>+</sup>, NLS-Mif1 et NLS-Mif1- $\Delta$ Ex3<sup>+</sup>.

Merci également à Natacha Pierre-Charles pour le vecteur pEGFPN1/Mif1.

## **1. Introduction**



## 1.1 Hématopoïèse

L'hématopoïèse est la génération de différents types de cellules sanguines à partir d'une quantité limitée de cellules souches hématopoïétiques (HSC). Deux propriétés principales définissent les HSC : elles sont capables d'autorégénération et elles ont le potentiel de se différencier en une variété de progéniteurs hématopoïétiques qui sont ensuite commis vers différentes lignées cellulaires pour donner des cellules sanguines matures (Orkin et Zon, 2002) (figure 1). Chez les vertébrés, le développement des

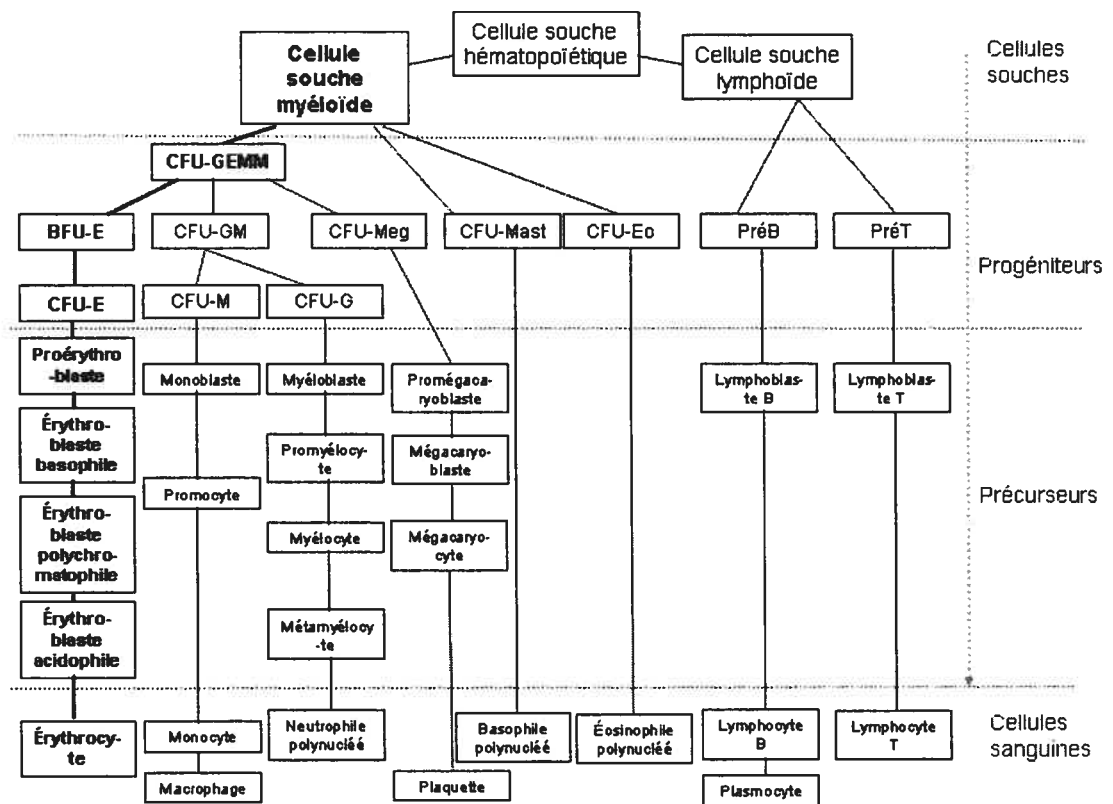


Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse définitive (adapté de Charpentier (1996)).

cellules sanguines survient en deux vagues successives. La première vague, que l'on nomme hématopoïèse primitive, se produit dans le sac vitellin et conduit principalement à la production de cellules érythroïdes nucléées. La deuxième vague, l'hématopoïèse définitive, est initiée dans la région AGM (aorte-gonade-

mésonephros), puis passe rapidement dans le foie fœtal pour finalement s'établir dans la moelle osseuse chez l'adulte. L'hématopoïèse définitive quant à elle permet la production des cellules de toutes les lignées hématopoïétiques (Dzierzak *et al.*, 1998; Orkin et Zon, 2002). La différenciation en une variété de lignées cellulaires est en partie le résultat de l'interaction de signaux extracellulaires (facteurs de croissance hématopoïétiques) avec des récepteurs membranaires et de la signalisation intracellulaire qui influence ultimement la transcription de gènes par des facteurs de transcription spécifiques (Klinken, 1999). Afin de bien introduire mes travaux, il est pertinent d'introduire les concepts d'érythropoïèse et de myélopoïèse.

La différenciation vers la lignée érythroïde est dirigée par des signaux extracellulaires, tel que l'interleukine 3 (IL3) et l'érythropoïétine (EPO), qui activent des voies d'inductions qui modifient l'expression de gènes dont plusieurs facteurs de transcription qui sont tissu-spécifiques. Parmi les facteurs de transcription essentiels à l'érythropoïèse, les facteurs GATA-1, GATA-2 et SCL jouent un rôle de premier plan (Orkin, 2000). D'autres facteurs de transcription sont plutôt requis pour l'activation précise de gènes tissu-spécifiques lors de la différenciation, c'est le cas du facteur EKLF (« Erythroid Krüppel-Like Factor ») qui est essentiel pour l'activation du gène de la  $\beta$ -globine dans les dernières étapes de la différenciation (Wijgerde *et al.*, 1996). Ce facteur de transcription, qui se lie *in vivo* aux sites hypersensibles HS2, HS3 et HS4 du LCR (« locus control region ») du locus de la  $\beta$ -globine ainsi qu'au promoteur du gène  $\beta$ , est essentiel pour l'expression de la  $\beta$ -globine adulte (Donze *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 2001). EKLF forme un complexe avec des membres de la famille de protéines SWI/SNF (Armstrong *et al.*, 1998). Donc, une des fonctions de EKLF dans la régulation du gène de la  $\beta$ -globine semble être le remodelage de la chromatine au promoteur du gène de la  $\beta$ -globine en une structure active.

La différenciation myéloïde est quant à elle contrôlée principalement par différents facteurs de croissance tel que le G-CSF (« granulocyte colony stimulating factor »), le M-CSF (« macrophage colony stimulating factor »), le GM-CSF (« granulocyte-macrophage colony stimulating factor ») et l'IL-3. De façon générale, les CSF jouent un rôle important au niveau de la survie, de la prolifération et de la différenciation cellulaire et ils sont relativement lignée-spécifiques (Barreda *et al.*, 2004; Kawamoto

et Minato, 2004). La différenciation myéloïde repose également sur l'interaction entre plusieurs facteurs de transcription, tels que PU.1, Sp1, C/EBP $\alpha$ , Maf-B et c-Myb, et de leur liaison sur différents gènes (Friedman, 2002).

## 1.2 Désordres sanguins

La finalité de l'hématopoïèse est la production de cellules sanguines qui se retrouvent en circulation dans le corps via le système sanguin. Chez les gens en santé, des millions de nouvelles cellules sanguines sont produites à chaque heure afin d'accomplir d'importantes fonctions dans l'organisme (Dreyfus *et al.*, 1992). L'organisme prend soin de réguler l'activité de la moelle osseuse afin que le mécanisme de l'hématopoïèse produise le nombre adéquat de cellules de chaque type. À l'occasion, des désordres de l'hématopoïèse peuvent survenir à différents niveaux et ainsi causer des maladies du sang. Par exemple, un déficit de la production de l'une ou l'autre des chaînes de la globine amène un déséquilibre du ratio 2:2 entre l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -globine dans l'hémoglobine causant l' $\alpha$ - ou la  $\beta$ -thalassémie. Il y a donc diminution de la synthèse d'hémoglobine et précipitation des chaînes de globines en excès dans les cellules. Les thalassémies mènent souvent à l'anémie (Wijgerde, 1998). L'anémie est définie par une réduction considérable du nombre d'érythrocytes dans le sang. Il existe plusieurs causes à l'anémie, mais la plus commune est une carence en fer (Munker *et al.*, 2000). D'autres maladies sanguines ont une incidence importante dans la population. C'est le cas du syndrome de myélodysplasie (voir section 1.2.1) et de la leucémie. La leucémie est en fait un cancer des cellules de la moelle osseuse. Il existe plusieurs types de leucémies et elles peuvent être divisées en différentes catégories, soit les leucémies aiguës myéloïdes (AML) (voir section 1.2.2) ou lymphocytaires (ALL) et les leucémies chroniques myéloïdes (CML) ou lymphocytaires (CLL). Les leucémies surviennent généralement suite à des anomalies chromosomiques telles que des translocations, des inversions, ou des délétions de régions dans l'ADN contenant des gènes importants pour la régulation de l'hématopoïèse.

Le déterminant génétique couramment associé à la CML, dans plus de 90% des cas, est la présence du chromosome Philadelphie (Ph1). Le chromosome Philadelphie est le résultat d'une translocation réciproque entre le bras long du chromosome 9 et celui du chromosome 22. Cette translocation a pour effet de produire le gène de fusion BCR-ABL (Ben-Neriah *et al.*, 1986; Munker *et al.*, 2000; Rowley, 1973). Trois stades cliniques bien distincts peuvent être identifiés pour la CML. Il y a tout d'abord la phase chronique initiale qui est caractérisée par une augmentation, par rapport à la normale, du nombre de leucocytes matures dans le sang et dans la moelle osseuse. Ensuite, la phase accélérée se caractérise par une augmentation du nombre de blastes. Enfin, la phase blastique se distingue par une augmentation rapide du nombre de blastes myéloïdes et lymphoïdes (Calabretta et Perrotti, 2004). C'est lors de la transformation de la maladie vers la phase blastique que l'on observe une accumulation du nombre d'anomalies génétiques dans les cellules telles que les trisomies des chromosomes 8 et 19 (Mitelman, 1993) et des mutations dans le gène suppresseur de tumeur p53 (Di Bacco *et al.*, 2000).

La transformation et la prolifération clonale des cellules souches lymphoïdes sont les premiers événements à se produire dans les cas d'ALL (Munker *et al.*, 2000). La majorité des cas d'ALL sont retrouvés chez les enfants et les jeunes adultes, mais les personnes âgées peuvent également être atteints (Munker *et al.*, 2000). Les principales aberrations génétiques associées avec l'ALL sont la translocation TEL1-AML1 et l'hyperploïdie (>50 chromosomes) chez les enfants, et la translocation BCR-ABL (Ph1) et le réarrangement du gène MLL chez les adultes (Pui *et al.*, 2004). Ces altérations chromosomiques provoquent une importante augmentation du nombre de blastes lymphoïdes dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique.

La CLL est une maladie où il y a surproduction de lymphocytes B immatures par la moelle osseuse et par les organes lymphoïdes. La CLL des cellules T existe, mais elle est beaucoup plus rare. Les marqueurs cytogénétiques les plus fréquemment observés dans les cas de CLL sont la trisomie du chromosome 12 et des délétions dans les chromosomes 11 et 13 (Munker *et al.*, 2000).

### 1.2.1 Le syndrome de myélodysplasie (MDS)

Les myélodysplasies (MDS) sont un groupe hétérogène de désordres clonaux des cellules souches hématopoïétiques. Le syndrome de myélodysplasie évolue souvent vers une AML. Les MDS ont une incidence élevée chez les personnes âgées, mais les jeunes adultes et les enfants peuvent aussi en être atteints (Hirai, 2002; Munker *et al.*, 2000). Les MDS peuvent être divisés en cinq sous-types selon la classification franco-américano-britannique (FAB), voir le tableau I (Bennett *et al.*, 1982). Le nombre de blastes dans la moelle osseuse donne une indication sur le risque qu'a un

Tableau I : Classification FAB des syndromes de myélodysplasie<sup>1</sup>

Sous-types		Blastes	
		Sang périphérique	Moelle osseuse
RA	Anémie réfractaire	<1%	<5%
RARS	RA avec sidéroblastes en couronne	<1%	<5% et sidéroblastes en couronne >15%
RAEB	AR avec excès de blastes	<5%	5-20%
RAEB-t	RAEB en cours de transformation	>5-30%	21-30%
CMML	Leucémie myélomonocytaire chronique	<5%	<20%

<sup>1</sup> : Bennett *et al.* (1982); Mehta et Hoffbrand (2003)

patient de développer une AML. Donc, les patients classés RA et RARS possèdent une faible prédisposition de voir leur maladie évoluer vers une leucémie, alors que les patients RAEB, CMML et évidemment les RAEB-t ont un haut risque de transformation de leur MDS en AML (Mehta et Hoffbrand, 2003). Les manifestations cliniques diffèrent selon le type de MDS. De façon générale, les MDS sont caractérisées par une hématopoïèse inefficace conduisant à une cytopénie dans le sang périphérique, c'est-à-dire que la production de un ou plusieurs types cellulaires sanguins matures (érythrocytes, leucocytes et plaquettes) cesse ou est grandement réduite. De plus, la moelle osseuse est habituellement hypercellulaire et il y a augmentation de l'apoptose malgré un accroissement de la prolifération cellulaire dans la moelle osseuse (Greenberg, 1998; Mehta et Hoffbrand, 2003; Munker *et al.*,

2000). Le développement d'un MDS est étroitement relié à l'accumulation de dommages à l'ADN dans les cellules souches hématopoïétiques. Les patients atteints d'un MDS présentent des anomalies de structure dans l'ADN, telles que des translocations, mutations et délétions, et ils peuvent également présenter une aneuploïdie; perte ou gain d'un chromosome complet. Le marqueur cytogénétique le plus fréquemment retrouvé dans les MDS est l'anormalité du chromosome 5 (Van den Berghe *et al.*, 1985). Les délétions et les translocations du chromosome 5 sont retrouvées dans plus de 20% des cas de MDS (Hirai, 2002). Plusieurs gènes codant pour des facteurs de croissance et récepteurs hématopoïétiques sont localisés sur le bras long du chromosome 5, c'est pourquoi un intérêt particulier est porté à cette région. Les points de cassure diffèrent grandement d'un patient à l'autre, toutefois la région 5q31 à 5q33 semble avoir une faiblesse chromosomique où il se produit plusieurs délétions (Boulton *et al.*, 1994; Hirai, 2002). Une autre anomalie moléculaire fréquente dans les MDS consiste en des mutations ponctuelles dans la famille des gènes Ras. Parmi les gènes Ras, les mutations ponctuelles les plus fréquentes sont celles qui affectent le gène N-Ras et ce dans 10 à 15% des cas de MDS. Ras possède la propriété de lier et d'hydrolyser le GTP (guanosine triphosphate) et est un membre de la voie de signalisation de la prolifération cellulaire. Une mutation dans Ras diminue son activité GTPase, ce qui a pour effet de garder la voie de prolifération cellulaire active (Hirai, 2002; Paquette *et al.*, 1993). Plusieurs autres lésions génétiques sont associées aux MDS, c'est le cas des translocations dans les gènes : TEL1, MLL, EVI-1, AML1 et nucléopore ainsi que des délétions dans les chromosomes 7 et 17 et de certaines altérations épigénétiques (Hirai, 2002).

### **1.2.2 La leucémie myéloïde aiguë (AML)**

La leucémie myéloïde aiguë (AML) est une affection maligne dans laquelle les blastes hématopoïétiques représentent plus de 30% des cellules de la moelle osseuse. Les personnes âgées (60-70 ans) sont plus souvent atteints d'AML alors que les enfants et les jeunes adultes peuvent avoir cette maladie, mais dans des proportions beaucoup plus faible (Munker *et al.*, 2000). L'AML est la forme la plus commune des leucémies, soit 36% de toutes les leucémies et 75% des leucémies aiguës

(« American cancer society », statistiques 2004). Tout comme les MDS, l'AML se divise en différents sous-types selon la classification FAB, voir le tableau II (Bennett *et al.*, 1985). Les chromosomes des cellules blastiques des patients atteints d'une AML montrent des translocations ou des inversions dans près de 80% des cas. Les anomalies chromosomiques se produisent souvent dans des régions codant pour des gènes importants pour la régulation de la transcription. Le gène hybride ainsi formé

Tableau II : Classification FAB des leucémies myéloïdes aiguës<sup>1</sup>

Sous-type	Caractéristiques
M0	Non différenciée
M1	Myéloïde, faible différenciation, >90% de blastes
M2	Myéloïde avec différenciation, 30-90% de blastes
M3	Promyélocytaire, avec granularité intense variante : avec microgranules atypiques
M4	Myélomonocytaire, avec myéloblastes et monoblastes leucémiques variante : M4Eo, présence d'éosinophiles
M5	Monocytaire, avec monoblastes
M6	Érythroleucémie, avec >50% de cellules mononucléaires érythroïdes et >30% de myéloblastes parmi les cellules non érythroïdes
M7	Mégacaryoblastique

<sup>1</sup> : Bennett *et al.* (1985); Mehta et Hoffbrand (2003); Munker *et al.* (2000)

code alors pour une protéine de fusion ayant des fonctions inhabituelles. Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes dans l'AML sont la translocation t(8;21) formant la protéine de fusion AML1-ETO, les translocations impliquant le chromosome 17 avec les chromosomes 5, 11 et 15 donnant respectivement les protéines NPM-RAR $\alpha$ , PLZF-RAR $\alpha$  et PML-RAR $\alpha$ , la translocation t(9;11) qui code pour MLL-AF9 et l'inversion sur le chromosome 16 produisant CBF $\beta$ -MYH11 (Look, 1997).

Les anomalies chromosomiques énumérées ci-dessus ont une fréquence élevée et comptent pour 38% de tous les cas d'AML (Look, 1997). Plusieurs autres translocations ayant une incidence plus faible ont été identifiées, mais peu de chose

sont connue sur ces dernières. La translocation t(3;5) qui produit la protéine de fusion NPM-MLF1 (voir section 1.3) est une de ces translocations à faible incidence. Elle compte pour 1% des cas d'AML (Look, 1997) et elle est également retrouvée dans certains cas de MDS. Les connaissances sur cette translocation sont restreintes et surtout ce qui concerne le facteur MLF1 et sa régulation anormale.

### 1.3 MLF1

Le gène MLF1 humain pour « myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1 » a été identifié et ainsi nommé lors de l'étude de la translocation chromosomique t(3;5)(q25.1;q34) par Yoneda-Kato *et al.* (1999). La translocation t(3;5) est connue depuis longtemps (Oshimura *et al.*, 1976; Rowley et Potter, 1976) comme étant impliquée dans les syndromes de myélodysplasie (MDS) et dans les leucémies myéloïdes aiguës (AML), sauf pour le sous-type M3 du FAB (Raimondi *et al.*, 1989). Le point de cassure de la translocation t(3;5), soit 3q25.1 et 5q34, a clairement été établi par Raimondi *et al.* (1989). Yoneda-Kato *et al.* (1996; 1999) ont quant à eux identifié et caractérisé la protéine de fusion que provoque la translocation. La translocation t(3;5) juxtapose, dans le même cadre de lecture, la partie 5' du gène de la nucléophosmine (NPM) (chromosome 5) et la partie 3' du gène MLF1 (chromosome 3) formant ainsi la protéine de fusion NPM-MLF1 (figure 2) (Yoneda-Kato *et al.*, 1996).

#### 1.3.1 Nucléophosmine

Le gène de la nucléophosmine (NPM; synonymes : B23 ou numatrine) est localisé sur le long bras distal du chromosome 5 et il est transcrit dans une orientation centromérique-télomérique (Morris *et al.*, 1994). NPM est une phosphoprotéine nucléolaire très conservée liant les ARNs non ribosomiaux (Borer *et al.*, 1989). Les fonctions de NPM semblent être très diverses. Une de ses principales fonctions est le transport des ribonucléoprotéines entre le nucléole et le cytoplasme pendant l'assemblage des ribosomes (Borer *et al.*, 1989; Olson *et al.*, 1986). Il a également été démontré que NPM pouvait interagir avec différentes protéines, tel que le facteur de transcription YY1 (Inouye et Seto, 1994) suggérant une influence directe ou



indirecte au niveau de la transcription de gènes (Lee et Lee, 1994). Une interaction entre NPM et la protéine MNDA (« myeloid cell nuclear differentiation antigen ») a également été démontrée (Xie *et al.*, 1997). La liaison de NPM à ces deux protéines aurait donc pour effet de réguler leurs fonctions et leur accessibilité via des interactions protéine-protéine. NPM serait également impliqué dans l'initiation de la duplication du centrosome. En phase G1-S du cycle cellulaire, NPM se dissocie du centrosome lorsque sa thréonine(199) est phosphorylée par le complexe CDK2/cycline-E, lequel initierait ensuite la duplication des centrioles. NPM se réassocie au centrosome à la mitose au moment de la fission membranaire (Okuda, 2002; Tokuyama *et al.*, 2001). Il a également été démontré que NPM régule l'activation de la transcription et la stabilité du suppresseur de tumeur p53 (Colombo *et al.*, 2002). Il a été suggéré qu'une dérégulation de la fonction de NPM par une translocation chromosomique pourrait amener une inactivation de p53 dans certains cas de leucémies (Colombo *et al.*, 2002). Toutefois, il semble que les différentes fonctions attribuées à NPM pourraient toutes être regroupées en un rôle plus général, c'est-à-dire celui de chaperon moléculaire (Szebeni *et al.*, 2003; Szebeni et Olson, 1999). NPM préviendrait donc l'agrégation protéique, protégerait certaines enzymes contre la dénaturation thermique et faciliterait la renaturation de protéines (Szebeni et Olson, 1999).

La protéine NPM contient plusieurs domaines fonctionnels identifiables (figure 2). Il y a tout d'abord un site potentiel de liaison d'un métal (M, figure 2) (motif : Cys-X<sub>5</sub>-His-X<sub>4</sub>-His où X peut être n'importe quel acide aminé (a.a.)). Il y a également deux régions d'acides aminés acidiques (Ac, figure 2) et deux signaux de localisation nucléaire (NLS, figure 2) (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). Il a été proposé que NPM lierait le NLS d'autres protéines lorsqu'il y a phosphorylation du domaine acides aminés acidiques (Szebeni *et al.*, 1995). Lorsque NPM effectue la navette entre le noyau et le cytoplasme, il est retrouvé sous forme d'un homo-oligomère hexamérique assemblé de manière tête-à-tête/queue-à-queue (Liu et Chan, 1991; Yung et Chan, 1987). NPM possède deux domaines nécessaires pour son oligomérisation : un en N-terminal qui semble être plus important et un en C-terminal (Bischof *et al.*, 1997; Liu et Chan, 1991). Le gène NPM est également impliqué dans deux autres

translocations chromosomiques soit la translocation t(2;5) formant la protéine de fusion NPM-ALK (Bischof *et al.*, 1997; Fujimoto *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1994) et la translocation t(5;17) qui donne la protéine NPM-RAR $\alpha$  (Pandolfi, 1996; Redner *et al.*, 1996).

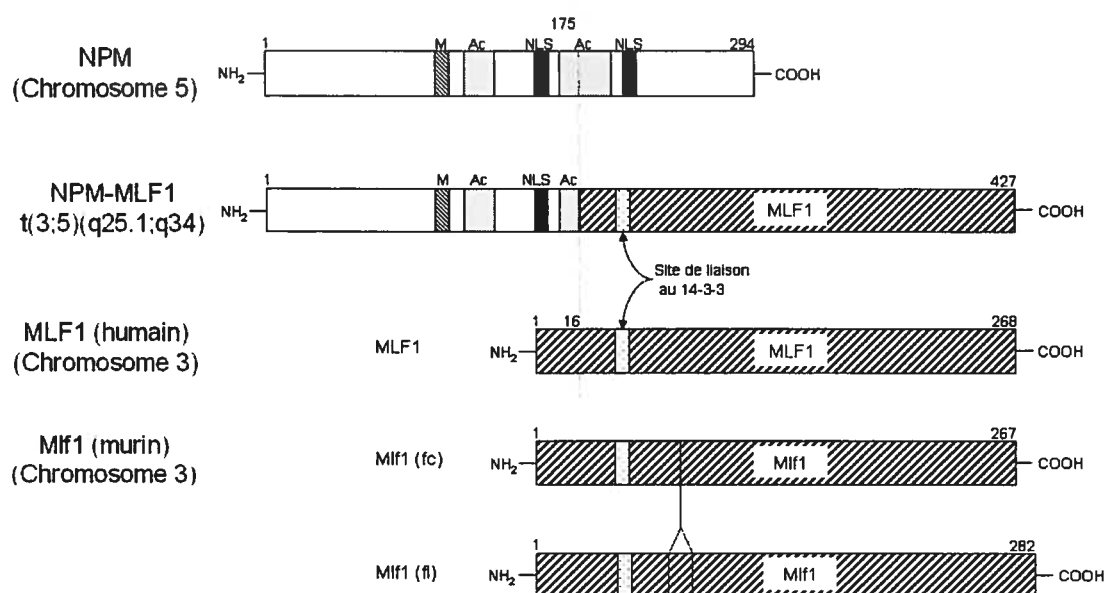


Figure 2 : Représentation schématique de NPM, NPM-MLF1, MLF1 et Mlf1. Où M : site potentiel de liaison d'un métal, Ac : acides aminés acides, NLS : signal de localisation nucléaire, fc : forme courte, fl : forme longue, les nombres représentent les acides aminés et la ligne verticale représente le point de cassure de la translocation (adapté de Yoneda-Kato *et al.* (1996)).

### 1.3.2 NPM-MLF1

La translocation t(3;5) conduisant à la formation de NPM-MLF1 est réciproque, cependant l'ARN messager de fusion provient du dérivé chromosomique 5 et non du dérivé 3 (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). En comparant les trois translocations dans lesquelles NPM est impliqué, il est possible de voir que dans le cas de la translocation t(3;5), la partie NPM (de NPM-MLF1) conserve la majorité de ses domaines fonctionnels identifiables, soit le domaine de liaison d'un métal, un NLS et une partie de domaine acide (figure 2) (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). Dans le cas de

NPM-ALK et NPM-RAR $\alpha$  seul le domaine de liaison d'un métal est conservé (Morris *et al.*, 1994; Pandolfi, 1996). Notons également que dans les trois translocations le domaine N-terminal nécessaire pour l'oligomérisation est conservé (Bischof *et al.*, 1997; Pandolfi, 1996; Yoneda-Kato *et al.*, 1996). La protéine NPM-MLF1 est localisée dans le noyau et le nucléole des cellules. Yoneda-Kato *et al.* (1996) proposent que cette localisation serait due au fait que le NLS de NPM est conservé suite à la translocation.

Il a été démontré que NPM-MLF1 induit l'apoptose des cellules K562 et HEL et qu'il induit l'apoptose des cellules NIH 3T3 suite à une privation en sérum (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). Par contre, il a été démontré que la cinétique de l'apoptose induite par NPM-MLF1 était plus lente si l'on compare à celle obtenue avec d'autres inducteurs d'apoptose tel que c-Myc et E2F-1 (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). L'étude de différentes délétions de la protéine NPM-MLF1, par Yoneda-Kato *et al.* (1999), a permis de déterminer qu'il y aurait un domaine important pour l'induction de l'apoptose par NPM-MLF1 dans la partie N-terminale de la région MLF1. Ils ont aussi démontré que le NLS de NPM est important pour provoquer l'apoptose et que la délétion du domaine de dimérisation de NPM viendrait diminuer l'effet apoptotique de NPM-MLF1 (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). Toutefois, il semble que NPM-MLF1 n'induit pas uniquement l'apoptose des cellules. L'expression de NPM-MLF1 confère également un avantage prolifératif aux cellules. Cet aspect a été démontré en cosurexprimant, dans des NIH 3T3, NPM-MLF1 et la protéine anti-apoptotique Bcl-2, alors que seule la surexpression de Bcl-2 ne donnait aucun avantage prolifératif (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). Ceci suggère donc que NPM-MLF1 serait impliqué dans au moins deux voies de signalisation différentes. Ces deux voies (ou une des deux) pourraient donc être impliquées dans l'induction de MDS et la progression, dans certains cas, vers une AML.

### 1.3.3 MLF1 humain

Le gène MLF1 humain est localisé sur le chromosome 3 et il encode pour une protéine de 31kDa qui ne montre pratiquement aucune homologie de séquence avec d'autres protéines connues (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). La seule homologie qui a été

observée est celle avec un nouveau gène nommé MLF2 pour lequel très peu de choses sont connues. MLF2 est une protéine exprimée de façon ubiquitaire et qui présente 63% de similarité et 40% d'identité avec MLF1 (Kuefer *et al.*, 1996). MLF1 ne contient aucun domaine fonctionnel identifiable à l'exception d'un site de liaison aux protéines de la famille des 14-3-3 (Hitzler *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999) et le domaine d'induction de l'apoptose en N-terminal proposé par Yoneda-Kato *et al.* (1999).

L'expression de MLF1 est tissu-spécifique. Il a été démontré que MLF1 était exprimé chez l'adulte dans le cœur, les muscles squelettiques, les reins, la prostate, les testicules, les ovaires, l'intestin grêle, le colon et de façon plus faible dans la rate, le thymus et le sang périphérique. Chez le fœtus, l'expression dans le cœur, les poumons et les reins a pu être détectée. Les lignées cellulaires érythroleucémiques humaines K562 et HEL expriment aussi MLF1 (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). Matsumoto *et al.* (2000) ont isolé différentes populations de cellules de la moelle osseuse humaine normale, soit : les CD34+ (progéniteurs hématopoïétiques), GlyA+ (marqueur tardif de la différenciation érythroïde), CD3+ (lymphocytes T), CD19+ (lymphocytes B), CD14+ (monocytes) et les granulocytes et ils ont vérifié l'expression de MLF1 dans chacune d'elles. Ils ont déterminé que les progéniteurs CD34+ exprimaient fortement MLF1 et que son expression diminuait au cours de la différenciation vers les différentes lignées cellulaires matures.

L'expression de MLF1 a aussi été analysée chez des patients ayant une AML, un MDS ou une AML subséquente à un MDS (AML post-MDS), mais n'ayant pas la translocation t(3;5)(q25.1;q34) (Matsumoto *et al.*, 2000). Cette étude a révélé des niveaux d'expression significativement élevés de MLF1 non réarrangé, et ce avec une fréquence relativement élevée chez ces patients (7/65 AML, 3/12 AML post-MDS et 7/44 MDS) (Matsumoto *et al.*, 2000). De façon plus détaillée, ils ont premièrement observé chez les patients ayant une AML de type M1, M2, M6 et M7 une forte expression de MLF1; chez ceux ayant une AML de type M5, ils ont noté une expression légèrement supérieure de MLF1; finalement dans les AML de type M3 et M4, on remarque une moindre expression de MLF1 comparativement à l'expression de MLF1 dans le sang périphérique normal et la moelle osseuse normale (contrôles).

Deuxièmement, leur analyse des patients atteints d'un MDS a permis d'observer une expression de MLF1 égale au niveau d'expression observé dans les contrôles chez les patients ayant un MDS à faible risque de développer une AML, soit les types RA et RARS. Pour ce qui est des patients avec un MDS de type RAEB et RAEB-t, à haut risque de développer une AML, ils ont observé une expression élevée de MLF1. Donc la surexpression de MLF1 semble être associée à un risque élevé de développer une AML. Finalement, chez les patients AML post-MDS, ils observent des niveaux élevés de MLF1 dans leurs cellules sanguines et ils ont également observé que lorsqu'il y a transformation de la maladie (MDS vers AML et dans un cas de MDS RAEB vers RAEB-t), qu'il y avait une augmentation de l'expression de MLF1 (Matsumoto *et al.*, 2000). Ils ont également déterminé que les manifestations cliniques des patients ayant une expression élevée de MLF1 non réarrangé sont similaires à celles observées chez les patients ayant la translocation t(3;5) (Matsumoto *et al.*, 2000). Toutefois, le mécanisme par lequel on observe une augmentation de la régulation de MLF1 dans les cas d'AML, de MDS à haut risque et AML post-MDS demeure inconnu.

### 1.3.4 Homologue murin de MLF1 (Mlf1)

L'homologue murin de MLF1, nommé Mlf1, a été identifié par Hitzler *et al.* (1999) et indépendamment par Williams *et al.* (1999) qui eux l'ont nommé HLS7 pour « hemopoietic lineage switch gene 7 ». L'homologie de séquence entre Mlf1 murin et MLF1 humain est de 86% (Hitzler *et al.*, 1999). Le gène codant pour la protéine Mlf1 est situé dans la région centrale du chromosome 3 murin (Hitzler *et al.*, 1999). Tout comme MLF1, Mlf1 n'a que le site de liaison aux protéines 14-3-3 comme domaine fonctionnel identifiable et il se situe aux résidus 31 à 36 de la protéine (Hitzler *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999). La séquence en acide aminé du site de liaison est RSFSEP, ce qui correspond à un des motifs identifiés pour la liaison des protéines 14-3-3 (voir section 1.3.5).

L'expression de Mlf1 est tissu-spécifique tout comme l'est son homologue humain. Chez la souris, l'expression de Mlf1 a été démontrée dans le cœur, les muscles squelettiques, les testicules et les poumons, mais son expression n'a pas été détectée dans la rate, le foie et les reins (Hitzler *et al.*, 1999). Il est donc envisageable de

penser que Mlf1 puisse jouer un rôle important au niveau de la fonction de ces tissus, entre autre au niveau de la différenciation cellulaire. De plus, l'analyse de différentes lignées de cellules de souris a démontré que généralement Mlf1 était exprimé dans les lignées cellulaires immatures. C'est le cas entre autres des cellules myéloïdes immatures W265, 2Mes/raf, M1, J2E-m2; des progéniteurs des cellules B 1-Bra, 3-Mes ainsi que des cellules érythroleucémiques F4N et 707 (non différenciées) (Williams *et al.*, 1999). Les cellules J2E-m2 (Keil *et al.*, 1995) ont été identifiées suite à un « lineage switch » spontané vers la lignée myéloïde des cellules érythroleucémiques J2E, qui sont des cellules immortalisées au stade proérythroblaste de leur différenciation (Klinken *et al.*, 1988). Par la suite, il a été démontré que les cellules J2E-m2 exprimaient Mlf1 alors que les J2E ne l'expriment pas (Williams *et al.*, 1999). Les cellules J2E-m2, contrairement aux cellules J2E, sont des cellules adhérentes qui ne répondent pas à une stimulation à la différenciation par l'EPO et qui n'expriment pas le marqueur de surface érythroïde Ter119. De plus, elles possèdent des niveaux réduits des facteurs de transcription érythroïdes GATA-1, NF-E2 et EKLF (Keil *et al.*, 1995). Dans tous les cas mentionné ci-dessus, c'est Mlf1 endogène qui a été détecté. Par contre, lorsqu'on surexprime Mlf1 dans certains types cellulaires, différentes observations ont pu être faites. Premièrement, la surexpression de Mlf1 dans les cellules M1 favorise leur différenciation en macrophages (Williams *et al.*, 1999). Deuxièmement, la surexpression de Mlf1, dans les cellules 707 et dans des cellules érythroïdes normales (progéniteurs érythroïdes isolés d'un foie fœtal), provoque un blocage de leur différenciation vers la lignée érythroïde et favorise la maturation de cellules de la lignée myéloïde (Williams *et al.*, 1999). Troisièmement, il a été démontré que la différenciation érythroïde induite par l'EPO provoque une accumulation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>Kip1</sup>. Cela amène la suppression de l'activité kinase du complexe CDK2/cycline-E et il s'en suit un arrêt du cycle cellulaire (Hsieh *et al.*, 2000). Lorsque les cellules J2E sont exposées à l'EPO, on observe une poussée de la prolifération. Ensuite, les cellules se différencient et sortent du cycle cellulaire. Il y a finalement production d'hémoglobine et des changements morphologiques s'opèrent menant à la production d'érythroblastes et d'érythrocytes (Busfield et Klinken, 1992; Tilbrook *et al.*, 1997).

Par contre, suite à l'induction à la différenciation par l'EPO de cellules J2E transfectées avec Mlf1 qui surexpriment ce dernier, il a été démontré que ces cellules ne synthétisaient pas d'hémoglobine. Aucun changement morphologique associé à la maturation érythroïde n'était observable; ces cellules démontraient plutôt, comme les J2E-m2, un phénotype monoblastique (Williams *et al.*, 1999; Winteringham *et al.*, 2004). De plus, lorsque Mlf1 est surexprimé dans les cellules J2E induite par l'EPO, les composants Cul1 et Skp2 du complexe ubiquitine ligase E3 SCF<sup>Skp2</sup> demeurent élevés ce qui prévient l'accumulation de p27<sup>Kip1</sup> via sont ubiquitination et sa dégradation au protéasome (figure 3) (Winteringham *et al.*, 2004). Donc, s'il n'y a pas d'accumulation de p27<sup>Kip1</sup> dans la cellule, il n'y a pas d'inhibition du complexe CDK2/cycline-E et par conséquent, pas d'arrêt du cycle cellulaire. Même si Mlf1

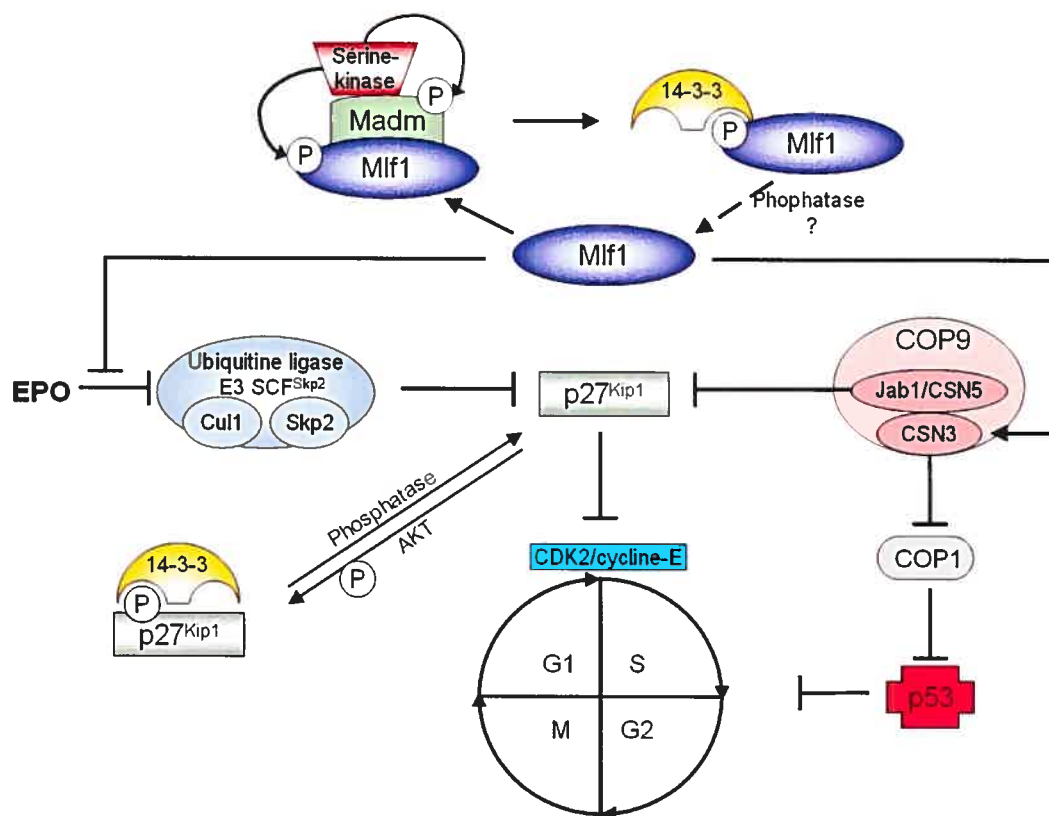


Figure 3 : Les interactions et l'implication possible de Mlf1 dans différentes voies de signalisation cellulaires.

altère significativement le phénotype érythroïde des cellules J2E, l'état de phosphorylation des composants de la voie de signalisation : récepteur à l'EPO—STAT5—Map kinase, demeure normal suite à l'induction à la différenciation avec l'EPO. Toutefois, une diminution du nombre de récepteurs à l'EPO a été observée (Williams *et al.*, 1999). Contrairement aux cellules J2E-m2, les cellules J2E induites exprimant Mlfl de façon ectopique possèdent des niveaux normaux des facteurs de transcription érythroïdes GATA-1, NF-E2 et EKLF (Williams *et al.*, 1999).

### 1.3.5 Protéines 14-3-3

Les protéines de la famille 14-3-3 sont exprimées dans une grande variété d'organismes et elles sont exprimées de façon ubiquitaire. Leur structure primaire est très conservée, que ce soit au cours de l'évolution ou entre les différents organismes. Ceci suggère un mécanisme d'action moléculaire commun aux différentes espèces (Aitken *et al.*, 1992; Dougherty et Morrison, 2004; Palmgren *et al.*, 1998). La plupart des organismes possèdent plus d'un isoformes des protéines 14-3-3. Par exemple les mammifères possèdent 7 isoformes ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\zeta$ ,  $\tau$  et  $\eta$ ) (Aitken, 1996). Les protéines 14-3-3 se dimérisent via leur domaine N-terminal et elles peuvent former des homo- et des hétérodimères (Jones *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1995). La dimérisation forme deux poches de liaison avec lesquels le dimère 14-3-3 peut interagir, soit en se liant à un ou deux motifs d'une même protéine, soit en liant deux partenaires différents (Dougherty et Morrison, 2004). Deux séquences consensus de liaison aux protéines 14-3-3 ont principalement été identifiées, soit RSXS<sup>P</sup>XP (Muslin *et al.*, 1996) et RXY/FXS<sup>P</sup>XP (Yaffe *et al.*, 1997) (où S<sup>P</sup> correspond à une phospho-sérine). La phosphorylation de la sérine du motif de liaison augmente l'affinité des protéines 14-3-3 pour leurs protéines cibles (Muslin *et al.*, 1996). Toutefois, dans certains cas l'interaction ne nécessite pas la phosphorylation de la sérine (Henriksson *et al.*, 2002; Nomura *et al.*, 2003). Il a été démontré que les protéines 14-3-3 pouvaient se lier à plusieurs protéines diverses telles que : Raf (Fantl *et al.*, 1994), BAD (Zha *et al.*, 1996), BAX (Nomura *et al.*, 2003), Cdc25C (Peng *et al.*, 1997), p53 (Waterman *et al.*, 1998), p27<sup>Kip1</sup> (figure 3)



(Sekimoto *et al.*, 2004), Bcr et Bcr-Abl (Reuther *et al.*, 1994), PI3-kinase (Bonney-  
Berard *et al.*, 1995), protéine kinase C (PKC) (Aitken *et al.*, 1995) ainsi que les  
histones déacétylases (HDAC) 4 et 5 (Grozinger et Schreiber, 2000). L'interaction de  
ces différentes protéines avec les 14-3-3 résulte en leur implication dans différents  
processus métaboliques importants pour la cellule tels que : la régulation du cycle  
cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la transcription, la localisation  
cellulaire des protéines (ex. : séquestration dans le cytoplasme), la coordination de la  
transmission du signal dans les voies de signalisation, la stabilité des protéines ainsi  
que l'initiation et l'inhibition des interactions entre protéines (Dougherty et Morrison,  
2004; Mhawech, 2005; Palmgren *et al.*, 1998). Tel qu'attendu, il a été démontré, par  
un essai double hybride chez la levure et par immunoprécipitation, qu'il y avait  
interaction entre Mlfl et un membre de la famille des protéines 14-3-3, soit 14-3-3 $\zeta$   
(Lim *et al.*, 2002). La phosphorylation de la sérine(34) du motif RSFS<sup>P</sup>EP de Mlfl  
est essentielle pour l'interaction entre Mlfl et 14-3-3 $\zeta$ . La phosphorylation de Mlfl  
est indirectement causée par la l'interaction de Mlfl avec la protéine Madm (« MLF1  
adaptor molecule ») (Lim *et al.*, 2002).

### 1.3.6 Madm

La protéine Madm est une protéine de 60kDa qui contient plusieurs domaines  
fonctionnels (Lim *et al.*, 2002). L'homologue humain, NRBP, possède 98%  
d'identité avec Madm et il a été identifié comme étant une protéine liant les  
récepteurs nucléaires parce qu'il possède deux motifs LXXLL liant les récepteurs  
nucléaires (Hooper *et al.*, 2000). Madm contient un domaine kinase similaire à  
plusieurs protéines kinases, mais dans la majorité des protéines kinases un motif  
conservé liant l'ATP est présent, motif qui n'est pas retrouvé dans la séquence de  
Madm. Malgré que certaines kinases n'ayant pas le motif de liaison à l'ATP ont été  
identifiées, il a été démontré que Madm ne possède pas l'activité catalytique d'une  
kinase (Lim *et al.*, 2002). Madm contient aussi un NLS, un signal potentiel  
d'exportation nucléaire et plusieurs sites potentiels de phosphorylation (Lim *et al.*,  
2002), suggérant que sa localisation intracellulaire est régulée par ces différents  
motifs.

Madm et Mlf1 peuvent être co-immunoprécipités. De plus, la colocalisation des deux protéines a été observée principalement dans le cytoplasme et de façon plus spécifique dans la région périnucléaire (Lim *et al.*, 2002). Un domaine liant Mlf1 a été identifié dans la région N-terminale de Madm (a.a. 406 et 479). Pour ce qui est de Mlf1, deux régions ont été identifiées comme étant importantes pour l'interaction avec Madm : une région en N-terminal (a.a. 39 à 82) et une région en C-terminal (a.a. 163 à 227) (Lim *et al.*, 2002). Il a également été démontré que Madm pouvait lier NPM-MLF1, mais plus faiblement qu'avec Mlf1. Ceci est probablement lié au fait que Madm n'interagit avec NPM-MLF1 qu'au niveau de la région centrale de la protéine de fusion (Lim *et al.*, 2002).

Tel que mentionné précédemment, Madm possède un domaine kinase, mais ne possède pas d'activité kinase. Lim *et al.* (2002) ont démontré que Madm recrute une sérine-kinase, cette dernière phosphoryle Madm ainsi que Mlf1 sur le motif RSFS<sup>P</sup>EP (figure 3). La phosphorylation du motif permet la liaison entre Mlf1 et les protéines 14-3-3 (figure 3). Malgré que NPM-MLF1 soit phosphorylé sur le motif de liaison aux 14-3-3 suite à son association avec Madm et la sérine-kinase, les protéines 14-3-3 ne se lient pas à NPM-MLF1 (Lim *et al.*, 2002). Cela est probablement dû à un encombrement stérique lors du repliement de la protéine, ce qui fait que NPM-MLF1 ne peut être retenu dans le cytoplasme et est, par le fait même, transloqué au noyau via le NLS de NPM.

### 1.3.7 MLF1IP

Récemment, une nouvelle protéine a été identifiée comme étant capable de s'associer avec MLF1. Il s'agit de MLF1IP pour « MLF1-interacting protein » (Hanissian *et al.*, 2004). Le gène de MLF1IP est situé sur le chromosome 4 humain (position 4q35.1) et code pour une protéine de 46kDa (Hanissian *et al.*, 2004). MLF1IP contient plusieurs domaines fonctionnels tels que : deux NLS-biparties et deux NLS; plusieurs sites potentiels de phosphorylation; deux régions riches en acides glutamiques, sérines, prolines et thréonines (séquence PEST); deux motifs consensus LXXLL liant les récepteurs nucléaires et deux zippers à leucine potentiels (Hanissian *et al.*, 2004). Le domaine de liaison à MLF1 a été identifié dans la région centrale de MLF1IP (Hanissian *et al.*, 2004). MLF1IP a une expression tissu-spécifique similaire

à MLF1. MLF1IP est exprimé dans les cellules hématopoïétiques de façon lignée-spécifique et ce, principalement dans la lignée érythroïde (Hanissian *et al.*, 2004). D'après les différentes interactions possibles entre les protéines énumérées ci-dessus, il est possible que MLF1IP fasse partie d'un complexe multiprotéique dans lequel on retrouverait MLF1, 14-3-3 $\zeta$ , Madm et sa sérine-kinase associée.

### 1.3.8 p53

La protéine p53 est aussi appelée « la gardienne du génome » (Lane, 1992) puisque sa fonction principale est celle de suppresseur de tumeur. Suite à un stress cellulaire, p53 est activée ce qui lui permet d'activer plusieurs gènes cibles et voies de signalisation. La protection des cellules est assurée par les molécules activées par p53 qui induiront l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et ultimement l'induction de l'apoptose (Braithwaite *et al.*, 2005). Les fonctions de p53 sont contrôlées par différents mécanismes, que se soit par la régulation de sa transcription et de sa traduction, par des modifications post-traductionnelles ou par sa localisation cellulaire (Zamzami et Kroemer, 2005). Une inactivation de la protéine p53 fait qu'elle ne peut plus effectuer son rôle de suppresseur de tumeur et il y a donc prolifération cellulaire et inhibition de l'apoptose (Braithwaite *et al.*, 2005). De plus, les mutations dans p53 sont les anomalies moléculaires les plus souvent détectées dans les cas de cancers humains (Hollstein *et al.*, 1991). Récemment Yoneda-Kato *et al.* (2005) ont démontré, dans des cellules NIH 3T3 et MEF, que MLF1 avait une influence sur p53. Ils ont démontré que MLF1 interagissait spécifiquement avec la sous-unité 3 du signalosome COP9 (CSN3). L'expression de MLF1 aurait pour effet de réguler négativement COP1, qui possède une activité ubiquitine ligase E3 envers p53 (Dornan *et al.*, 2004), via CSN3. Il s'en suit une augmentation de p53 et un arrêt du cycle cellulaire (figure 3) (Yoneda-Kato *et al.*, 2005).

## 1.4 Les cellules souches embryonnaires (ES)

Les cellules souches embryonnaires (ES) sont de plus en plus utilisées de nos jours parce qu'elles constituent un modèle d'étude très intéressant. En effet, les cellules R1-ES (Nagy *et al.*, 1993) sont utilisées lors d'études *in vitro* et elles permettent aussi

la génération de souris transgéniques ou avec un gène inactivé (« knock out ») (Filippi et Sainteny, 2001). Les cellules ES sont un bon modèle cellulaire pour l'étude des voies de signalisation puisqu'elles sont capables de se différencier *in vitro* en différentes lignées cellulaires selon les facteurs de croissance avec lesquels elles sont mises en culture. En fait, elles récapitulent partiellement l'hématopoïèse (Filippi et Sainteny, 2001). Les cellules ES conservent leur totipotentialité lorsqu'elles sont cultivées en présence de LIF (« Leukemia Inhibitory Factor ») (Williams *et al.*, 1988). Le BMP (« bone morphogenic protein) peut également collaborer avec le LIF à cette fonction (Ying *et al.*, 2003). La présence de LIF dans le milieu stimule la dimérisation des récepteurs LIF et gp130 à la surface des cellules. Le complexe ainsi formé active la tyrosine kinase JAK qui phosphoryle les récepteurs LIF et gp130 sur leurs résidus tyrosines (Boulton *et al.*, 1994). Le complexe de récepteurs recrute ensuite STAT3 qui se fait aussi phosphoryler par JAK, ce qui active sa dimérisation. Le dimère STAT3 est alors transloqué au noyau où il active différents gènes cibles (Darnell, 1997), tel que c-Myc (Cartwright *et al.*, 2005). Cette voie permet donc de maintenir l'autorégénération des cellules et de bloquer leur différenciation. Les cellules ES sont grandement influencées par les cytokines, c'est pourquoi en retirant le LIF du milieu et en les cultivant en présence d'EPO, de SCF (« Stem Cell Factor ») et d'IL3, leur différenciation se fera vers les lignées érythroïdes et myéloïdes (Keller *et al.*, 1993). La première étape est la formation des corps embryonnaires (EB), puis lorsque ceux-ci sont cultivés en milieu semi-solide la différenciation permet la formation d'érythrocytes et de cellules myéloïdes (Keller *et al.*, 1993).

### 1.5 Apoptose

La cellule possède un mécanisme de mort cellulaire programmée appelé apoptose. La vie et la mort des cellules doivent être régulées, puisqu'une forte prolifération accompagnée d'une faible mortalité peuvent causer plusieurs problèmes cellulaires et même conduire au cancer (Krammer *et al.*, 1998). Les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire sont divisés en deux voies principales, soit la voie exogène et la voie endogène, desquelles nous allons survoler les grandes lignes.

Tout d'abord, la voie exogène qui est également appelée la voie impliquant les récepteurs de mort à la surface de la cellule sera décrite (figure 4A). Les récepteurs de mort font parti de la superfamille des récepteurs TNF (« tumor-necrosis factor »). Les récepteurs de mort sont activés par la liaison de leurs ligands soient les TNF (Schmitz *et al.*, 2000). Une fois que le récepteur de mort a lié son ligand respectif, il recrute FADD (« Fas-associated death domain protein ») qui est une protéine adaptatrice intracellulaire. À son tour FADD recrute les formes inactives des caspases 8 et 10 (Sprick *et al.*, 2000). Une fois recrutée au complexe d'induction du signal de mort, la procaspase 8 et la procaspase 10 sont clivées; ce qui résulte en leur activation (Shi, 2004). Les caspases 8 et 10 agissent comme des caspases initiatrices. Les caspases initiatrices activées, clivent les caspases effectrices. Ces caspases effectrices sont principalement les caspases 3, 6 et 7. Les caspases effectrices se clivent entre elles ce qui conduit à l'amplification de l'activation de la cascade protéolytique des caspases (Shi, 2004). Par la suite, les « substrats de mort » sont clivés par les caspases effectrices. Ces substrats de mort conduisent à plusieurs changements morphologiques et biochimiques caractéristiques. Ces modifications sont induites par le clivage de différents éléments ou protéines de la cellule. Le clivage des lamines nucléaires qui est impliqué dans la condensation de la chromatine et la réduction du noyau (Rathmell et Thompson, 1999) en est un exemple. Le relâchement de l'endonucléase, qui se rend au noyau pour dégrader l'ADN, est causé par le clivage de l'inhibiteur de la DNase CAD (Sakahira *et al.*, 1998). Un autre changement induit par les substrats de mort est le clivage des protéines du cytosquelette comme l'actine, la plectine et Rho kinase1 (Rock-1) induisant la fragmentation cellulaire et la formation de corps apoptotiques (Rathmell et Thompson, 1999). La cellule meurt suite à une exposition à ces différents signaux et les débris cellulaires sont phagocytés.

Maintenant, la voie endogène qui est également nommée voie impliquant les mitochondries sera brièvement détaillée (figure 4B). La voie endogène permet d'augmenter la réponse apoptotique. Suite à l'activation de la caspase 8, par la voie exogène, celle-ci vient cliver la protéine pro-apoptotique BID (Desagher et Martinou, 2000). Une fois clivée, BID se lie à la membrane de la mitochondrie, ce qui favorise

la libération du cytochrome c (Cyt c). Une fois relâché dans le cytosol, le Cyt c se lie à Apaf1 (« apoptotic protease activating factor 1 ») formant ainsi l'apoptosome. Par la suite, la procaspase 9 se lie à l'apoptosome et subi un clivage; il en résulte donc une caspase 9 activée (Desagher et Martinou, 2000). La caspase 9 vient s'ajouter à l'action des caspase 8 et 10 en clivant les caspases effectrices. Le reste de la cascade est la même que pour la voie exogène, c'est-à-dire le clivage des substrats de mort qui eux conduisent à l'apoptose.

La voie endogène est parfois induite par la protéine pro-apoptotique BAD. De façon intéressante, BAD interagit avec plusieurs isoformes des protéines 14-3-3 (Subramanian *et al.*, 2001). Cette interaction mène à la séquestration de BAD, l'empêchant ainsi d'interagir avec la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> (Tan *et al.*, 2000). Lorsque BAD est relâché, il inhibe Bcl-X<sub>L</sub> qui normalement empêche l'apoptose en inhibant Apaf1 et la relâche du Cyt c (Gross *et al.*, 1999) (figure 4B).

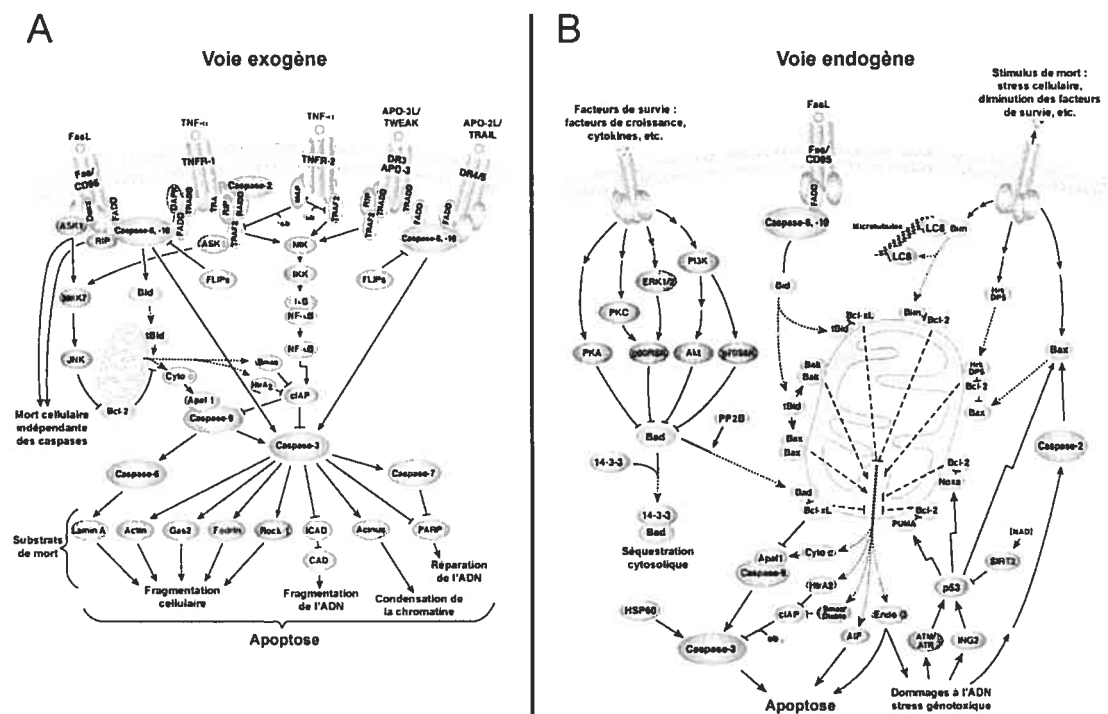


Figure 4 : Voies de l'apoptose. A) La voie exogène. B) La voie endogène. (Adapté de Cell Signaling Technology)

La régulation des deux voies de l'apoptose se fait par plusieurs mécanismes. Premièrement, il y a les protéines FLIPs qui se lient au récepteur de mort empêchant ainsi le clivage de la procaspase 8 (Krueger *et al.*, 2001). Deuxièmement, la régulation des voies de l'apoptose au niveau de la mitochondrie se fait à différents niveaux par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Troisièmement, l'apoptose peut être régulée par les IAPs (« inhibitor of apoptosis proteins »), qui inhibent les caspases en s'y liant (Deveraux et Reed, 1999).

### 1.6 Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire des cellules de mammifères se divise en quatre phases : la phase G1 (le premier « gap » de croissance), la phase S (synthèse de l'ADN), la phase G2 (le deuxième « gap » de croissance) et la phase M (mitose). Les cellules qui ne sont pas en cycle, sont en état de quiescence (phase G0) ou de différenciation (Deane *et al.*, 2005). La progression d'une phase à l'autre est un mécanisme bien régulé, puisqu'une phase ne peut débuter que si la précédente est complètement terminée. Les principaux acteurs dans la régulation du cycle cellulaire sont les cyclines, la famille des kinases sérine-thréonine dépendantes des cyclines (CDK), les inhibiteurs des CDK et les protéines régulatrices maîtresses : rétinoblastome (Rb), p53 et le facteur de transcription E2F (Deane *et al.*, 2005). La progression entre les différentes phases du cycle cellulaire est assurée par les CDK dont l'activation est déterminée par leur association avec une cycline et par des modifications post-traductionnelles (phosphorylations) (Sherr et Roberts, 1999). L'activité des complexes CDK/cycline est également régulée par deux grandes familles d'inhibiteurs : la famille INK4 comprenant les protéines p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> et p19<sup>INK4d</sup> et la famille CIP/KIP comprenant les protéines p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup> (Sherr et Roberts, 1999). En phase G1, la cellule décide si elle continue sa progression vers les autres phases du cycle, ce qui aboutira à la division cellulaire et à la prolifération, ou si elle quitte le cycle pour entrer dans un état de quiescence ou de différenciation. Cette décision est étroitement liée avec l'état de phosphorylation de Rb. Lorsque Rb est hypophosphorylée elle interagit avec les facteurs de transcription de la famille E2F, ce qui a pour effet d'inhiber la transcription de plusieurs gènes requis pour la

progression à travers le cycle cellulaire ou des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (Sherr et Roberts, 1999). À l'inverse, lorsque Rb est hyperphosphorylée elle n'interagit pas avec les E2F, il y a donc transcription et progression dans le cycle cellulaire (Sherr et Roberts, 1999). Le cycle cellulaire contient plusieurs points de contrôles où des mécanismes s'opèrent et empêchent la progression dans le cycle si les étapes précédentes n'ont pas été complétées ou si l'ADN est altéré. Ces points de contrôles sont entre autre régulés par Rb et p53. Une partie de la capacité de p53 à arrêter la cellule en G1 vient de l'activation de la transcription de l'inhibiteur de CDK p21<sup>Cip1</sup> (Sherr et McCormick, 2002). Enfin, les processus entourant le cycle cellulaire et la prolifération doivent être étroitement régulés, puisqu'un défaut dans une ou des voies de transmission des signaux reliés à la régulation du cycle cellulaire peut entraîner diverses maladies et le cancer.

### **1.7 Hypothèse de recherche et objectifs**

Le gène MLF1 est anormalement régulé dans plusieurs cas de MDS et d'AML. Nous croyons que la surexpression de MLF1 dans les cellules hématopoïétiques induit un dérèglement moléculaire qui favorise l'apparition de ces maladies. Pour investiguer la fonction de MLF1 et son influence sur les processus cellulaires lors de l'hématopoïèse, nous avons posé deux objectifs. Premièrement, obtenir un modèle cellulaire dans lequel le gène Mlfl murin est surexprimé. En se rapportant à ce qui a déjà été fait dans la littérature, différents types cellulaires auraient pu être utilisés pour étudier Mlfl. Toutefois, nous avons choisi les cellules ES puisqu'elles peuvent être maintenues au stade de cellules multipotentes et elles ont la capacité de récapituler partiellement l'hématopoïèse. Deuxièmement, étudier et caractériser les mécanismes moléculaires dans lesquels Mlfl est impliqué. Bien qu'il ait été proposé que MLF1 soit impliqué dans différents mécanismes cellulaires, cet objectif s'avère important puisque la fonction et les interactions de l'oncogène MLF1 demeurent à être clairement démontrées.



## **2. Matériel et méthodes**

## 2.1 Clonage

Le vecteur pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His a été obtenu suite à plusieurs étapes de clonage. Une PCR a d'abord été effectuée avec l'enzyme *pfu* (Promega) avec les amorces MLFF5' et MLFF3' (voir tableau III) sur le vecteur pEGFPN1/Mlfl (Figure 5A). Le produit de PCR a été digéré par *EcoR* I, puis cloné dans le vecteur pcDNA3.1B/V5-His (Invitrogen) préalablement digéré par *EcoR* I.

## 2.2 Mutagenèse dirigée

Les mutagenèses sur le vecteur pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His (figure 5C) ont été effectuées tel que décrit dans le manuel d'instruction de la trousse « QuickChange site-directed mutagenesis » (Stratagene) en utilisant les amorces MLF1-Ex3.1 et MLF1-Ex3.2 ou les amorces MLF1-NLS.1 et MLF1-NLS.2 (voir tableau III).

Afin d'obtenir la protéine de fusion Mlfl-GFP, la mutagenèse a été effectuée sur le vecteur pEGFPN1/Mlfl (figure 5A) avec la même trousse décrite ci-dessus, mais avec les amorces mutaMR26.1 et mutaMR26.2 (voir tableau III).

## 2.3 Cultures cellulaires et transfections

### 2.3.1 Cellules COS-7

Les cellules COS-7 (cellules de rein, singe vert africain) ont été cultivées dans du milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium » (DMEM) (Gibco), supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin (FBS) (Sigma) et de la pénicilline-streptomycine (100 U/ml et 100 µg/ml, respectivement) (Gibco). Les cellules ont été cultivées dans des incubateurs à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été passées tous les 2-3 jours selon la confluence, en ne dépassant pas 70% de confluence.

Les transfections stables et transitoires des cellules COS-7 ont été effectuées par électroporation. Pour ce faire,  $2 \times 10^6$  cellules resuspendues dans 400 µl du milieu de culture ont été électroporées avec 20 µg d'ADN dans une cuvette 4 mm, à 170 volts et à 950 µF (GenePulser Xcell, Bio-Rad). La sélection des clones stables a été

effectuée avec 1,1mg/ml de généticine (G418), puis une fois les clones isolés, ils ont été maintenus en présence de 600µg/ml de G418. Suite aux transfections transitoires par électroporation, les cellules ont été remises en culture dans des pétris qui contenaient des lames à microscope.

### 2.3.2 Cellules R1-ES

Les cellules R1-ES (cellules souches embryonnaires de souris) ont été cultivées dans des pétris préalablement traités avec de la gélatine 0,1%. La culture s'effectue dans du milieu ES (1 : 1 DMEM (Gibco) et milieu BRL conditionné (DMEM (Gibco), 10% FBS (Sigma), 0,1 mM d'acides aminés non-essentiels (Gibco), pénicilline-streptomycine (100 U/ml – 100 µg/ml) (Gibco)), supplémenté avec 6,6% ES-FBS caractérisé (Hyclone), 55 µM d'acides aminés non-essentiels, pénicilline-streptomycine (55 U/ml – 55 µg/ml), 100 µM de β-mercaptoéthanol (Sigma) et ESGRO (1000 U/ml) (Chemicon)). Les cellules ont été cultivées dans des incubateurs à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été passées tous les 2-3 jours selon la confluence, en ne dépassant pas 70% de confluence.

Les transfections stables des cellules R1-ES ont été effectuées par électroporation. Pour ce faire, 4-5 X10<sup>6</sup> cellules resuspendues dans 800 µl de PBS ont été électroporées avec 10 µg d'ADN dans une cuvette de 4 mm, à 400 volts et à 1260 µF (EC100 Electroporator, ThermoEC). La sélection des clones a été effectuée avec 200 µg/ml de G418.

Les transfections transitoires ont quant à elles été effectuées tel que décrit dans le manuel d'instruction du « FuGene6 Transfection reagent » (Roche). Les transfections ont été réalisées en utilisant des ratios FuGene6 : ADN de 3 : 2 ou de 3 : 1. De façon générale, les cellules ont été mises en culture 24 h avant la transfection dans des pétris de 10 X 10 cm contenant trois lames à microscope et 15 ml de milieu ES. Le jour de la transfection, 30 µl de FuGene6 ont été dilués dans 970 µl d'Opti-MEM (Gibco) avec 10 ou 20 µl d'ADN à une concentration de 1µg/µl et ajouté au milieu de culture.

## **2.4 Microscopie**

### **2.4.1 Immunofluorescence indirecte**

Les cellules ont été cultivées directement sur lame; les lames ont préalablement été traitées à la poly-L-lysine (Sigma) et dans le cas des cellules R1-ES, les lames ont également été traitées avec de la gélatine 0,1%. Les lames ont été récoltées 24, 48, ou 72 h après les transfections. Les cellules ont été fixées 30 min dans une solution de formaldéhyde 4% dans du PBS. Dans le cas des cellules R1-ES, une perméabilisation de 30 min avec 0,1% de Triton X-100 dans du PBS a été réalisée. Suite à deux lavages de 5 min, les lames ont été bloquées dans 5% de lait en poudre écrémé dans du PBS. Les lames ont ensuite été incubées avec la solution d'anticorps primaire : souris anti-V5 (Invitrogen) dilué 1 : 400 dans du PBS, 5% FBS et 0,1% Tween 20, pendant 45-60 min à température de la pièce. Après un lavage, les lames ont été incubées 45-60 min avec l'anticorps secondaire : chèvre anti-souris IgG-FITC (Sigma) dilué 1 : 400 dans du PBS, 5% FBS et 0,1% Tween 20. Suite au lavage et à la déshydratation des lames, les noyaux ont été colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (Sigma/Vector Laboratories).

### **2.4.2 Fluorescence directe (GFP)**

Les cellules ont été cultivées directement sur des lames traitées (poly-L-lysine et gélatine 0,1%). Les lames ont été récoltées 24 ou 48 après la transfection. Elles ont été fixées dans une solution de formaldéhyde 4% dans du PBS, pendant 30 min. Suite au lavage et à la déshydratation des lames, les noyaux des cellules ont été colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (Sigma/Vector Laboratories).

## **2.5 Extraction d'ARN**

Les extractions d'ARN ont été effectuées à l'aide du « Trizol Reagent » (Invitrogen), tel que décrit dans la fiche technique du produit. Pour l'expérience de RT-PCR, l'ARN de cellules ES a été extrait de  $1 \times 10^6$  cellules. Pour le transfert de type northern, l'ARN de cellules ES a été extrait à partir de  $5 \times 10^6$  cellules et à partir de

50-100mg de tissu de cœur et de rate de souris. L'ARN qui a été resuspendu dans 50 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> a été quantifié par spectrophotométrie.

## **2.6 Transfert de type northern**

Les différents ARNs ont été migrés sur gel d'agarose 1% (p/v), 10% MOPS 1X (v/v) et 0,63% formaldéhyde (v/v), puis transférés sur une membrane de nylon non chargée (Qiagen) par capillarité. La membrane a été préhybridée dans une solution de 6X SSC, 50% formamide, 5% Denhardt, 0,5% SDS et 0,24mg/ml d'ADN de sperme de saumon, pendant 4 h à 42°C. La membrane a ensuite été hybridée, avec un fragment d'ADNc de Mlfl marqué radioactivement, dans une solution de 50% formamide, NaCl 1M, 2,8% Denhardt, 0,5% SDS, 10% dextran sulfate et 0,24mg/ml d'ADN de sperme de saumon, à 42°C toute la nuit. La membrane a été lavée dans du 2X SSC, pour ensuite être exposée sur un écran, puis scannée au Phosphor-Imager (Storm 540, Amersham Pharmacia Biotech).

## **2.7 RT-PCR**

L'ARN a préalablement été traité avec 1U de DNaseI, grade d'amplification (Invitrogen) pour chaque microgramme d'ARN. L'ADN complémentaire total a été synthétisé à partir de 1µg d'ARN (traité à la DNaseI) à l'aide de l'enzyme de transcriptase inverse « SuperScript RT » (Invitrogen) en incubant pendant une heure à 37°C, suivi d'une incubation de 15 min à 70°C pour inactiver l'enzyme. Puis, l'expression de Mlfl a été analysée par une réaction de PCR avec les amorces MLFF5' et mMLF1-567 (voir tableau III). Les conditions de PCR sont les suivantes : 3 min à 95°C; 31 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 60°C et 30 sec à 72°C; puis une élongation finale de 5 min à 72°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 2%.

## **2.8 Transfert de type western**

Les extraits protéiques totaux ont été obtenus en resuspendant  $4 \times 10^5$  cellules dans 60  $\mu$ l de « sample buffer » (100mM Tris pH 6,8, 200mM DTT, 4% SDS, 0,2% bleu de bromophénol et 20% glycérol), puis les extraits ont été soniqués deux fois 5 sec et bouillis pendant 5 min. Les extraits protéiques (30  $\mu$ l) ont ensuite été soumis à une séparation sur un gel SDS-polyacrylamide de 15%, suivie d'un transfert sur une membrane Hybond ECL (Amersham Biosciences). La membrane a été bloquée avec du lait écrémé (5% dans du PBS). La membrane a ensuite été incubée pendant 1 h 45 min à température de la pièce avec l'anticorps primaire : souris anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology), dilué 1 : 800 dans du lait écrémé (1% dans du PBS). L'anticorps secondaire : chèvre anti-souris IgG conjugué à la peroxydase, dilué 1 : 1000 dans du lait écrémé (1% dans du PBS), a été incubé pendant 1 h 30 min à température de la pièce. Après chaque anticorps, la membrane a été lavée trois fois 10 min dans 0,05% Tween 20 dans du PBS. L'anticorps secondaire a été révélé avec une trousse de chemiluminescence ECL Plus (Amersham Biosciences), puis détecté avec le système d'imagerie LAS-3000 (Fuji Life Science).

## **2.9 Cytométrie en flux**

### **2.9.1 Phénotype**

Les cellules ES ont été trypsinisées (Trypsine-EDTA 1X (Gibco)), resuspendues dans du PBS et analysées en cytométrie en flux au FACScan (Becton Dickinson). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel CellQuest (BD Biosciences).

### **2.9.2 Tri cellulaire**

Les cellules du clone ES/Mif1-GFP #3 ont été récoltées par trypsinisation (Trypsine-EDTA 1X), resuspendues à une concentration de  $10 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu ES et analysées à l'aide d'un trieur munit de l'option DIVA (« Digitalized Vantage ») (Becton Dickinson). Suite au tri,  $2-3 \times 10^5$  cellules de chaque population (cellules GFP positives et cellules GFP négatives) ont été remises en culture.

### **2.9.3 Cycle cellulaire**

Pour l'analyse du cycle cellulaire,  $3-5 \times 10^5$  cellules ont été resuspendues dans 1 ml de 1,1% EDTA dans du PBS, auquel 3 ml d'éthanol froid a été ajouté, goutte à goutte en vortexant, pour fixer les cellules. Les échantillons ont ensuite été placés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour du marquage (les cellules peuvent être gardées ainsi pour plusieurs semaines). Le jour du marquage les échantillons ont été centrifugés, lavés avec 4 ml de 1,1% EDTA dans du PBS et centrifugés de nouveau. Les culots de cellules ont été resuspendus dans 1 ml de solution de Krishan (0,1% citrate de sodium, 0,02 mg/ml RNase A, 0,3% NP-40 et 0,05 mg/ml iodure de propidium (PI)). L'acquisition des données a été effectuée au FACScan (Becton Dickinson) avec le logiciel CellQuest (BD Biosciences), puis l'analyse a été effectuée avec le logiciel ModFit (Verity Software House).

### **2.10 Traitement à la clasto-lactacystine $\beta$ -lactone**

L'inhibiteur du protéasome, la clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone (Calbiochem), a été ajouté au milieu de culture des cellules ES à une concentration de  $10\mu\text{M}$ . Après une période d'incubation de 15 h, les cellules ont été récoltées et analysées tel que décrit à la section 2.9.1.

Tableau III : Liste des amorces utilisées

Nom donné à l'amorce	Séquence	Caractéristiques
MLFF5'	5'-TTGAATTCGCCACCATGTTCCGGA TGCTG-3'	Site <i>EcoR</i> I, séquence Kozak
MLFF3'	5'-GGGAATTCTTTTTGGTGATTTTCA CAGGTGATCC-3'	Site <i>EcoR</i> I, abolition du codon d'arrêt
mMLF1-567	5'-CGAATTCCTAATGACATGACC TCGG-3'	—
MLF1-Ex3.1	5'-GGCGAAGATTCCTTAACTCATGC AGATGTCAACCC-3'	Délétion de Ex3 <sup>+</sup>
MLF1-Ex3.2	5'-GGGTTGACATCTGCATGAGTTAA GGAATCTTCGCC-3'	Délétion de Ex3 <sup>+</sup>
MLF1-NLS.1	5'-CCATGTTCCGGATGAAGGTTCCA CAGAAAAAAGTAAACTGAGCA GCAGC-3'	Insertion du NLS
MLF1-NLS.2	5'-GCTGCTGCTCAGTTTTACTTTTT CTGTGGAACCTTCATCCGGAACA TGG-3'	Insertion du NLS
mutaMR26.1	5'-GGATCACCTGTGAAAATCACCAT GGTGAGCAAGGGCGAGG-3'	Abolition de codon d'arrêt, Mlfl en cadre avec EGFP
mutaMR26.2	5'-CCTCGCCCTTGCTCACCATGGTG ATTTTCACAGGTGATCC-3'	Abolition de codon d'arrêt, Mlfl en cadre avec EGFP



### **3. Résultats**

### 3.1 Établissement d'un modèle cellulaire fonctionnel

Afin de mieux étudier Mlf1 murin, nous avons d'abord voulu établir un modèle cellulaire surexprimant Mlf1. Nous avons en premier lieu choisi d'établir notre modèle cellulaire dans des cellules R1-ES pour les raisons énumérées en introduction; c'est-à-dire qu'elles peuvent récapituler partiellement l'hématopoïèse et qu'elles peuvent se différencier en différentes lignées cellulaires.

#### 3.1.1 Transfection stable de cellules R1-ES avec pEGFPN1/Mlf1

Le vecteur d'expression pEGFPN1/Mlf1\* (figure 5A) a été obtenu suite au clonage de Mlf1 placé sous le contrôle du promoteur CMV dans le vecteur pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech). L'ADN complémentaire (ADNc) a été obtenu en effectuant une réaction de transcription inverse (RT) sur un extrait d'ARN de cœur de souris suivie d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR, donc RT-PCR) avec des amorces spécifiques pour Mlf1. Le cœur a été utilisé parce que l'étude de Hitzler *et al.* (1999) révélait une forte expression de Mlf1 dans ce tissu. Dans le fragment obtenu suite à la RT-PCR, le codon d'arrêt de Mlf1 a été conservé. Par conséquent, le clonage de l'ADNc de Mlf1 dans pEGFP-N1 empêchait la traduction du gène EGFP (« enhanced green fluorescent protein ») contenu dans le vecteur. Ensuite, nous avons procédé à la transfection stable de pEGFPN1/Mlf1 dans des cellules R1-ES. Suite à deux transfections par électroporation distinctes, nous avons isolé respectivement 30 et 20 clones ES/Mlf1 après sélection à la généticine (G418, Gibco). Puis, lors de l'expansion des clones, nos observations nous ont permis de séparer les clones en deux types : les clones perdus par apoptose et les clones ayant une croissance normale. Suite aux deux transfections nous avons perdu 6 clones sur 30 et 5 clones sur 20. Ces clones ont montré une apoptose plus ou moins rapide, c'est-à-dire que nous avons perdu ces clones, respectivement, vers les jours 10 à 12 et vers le jour 22 post-électroporation. La mort des clones par apoptose a été confirmée par une coloration Wright-Geimsa des cellules (données non montrées).

---

\* Vecteur pEGFPN1/Mlf1 fait par Natacha Pierre Charles.

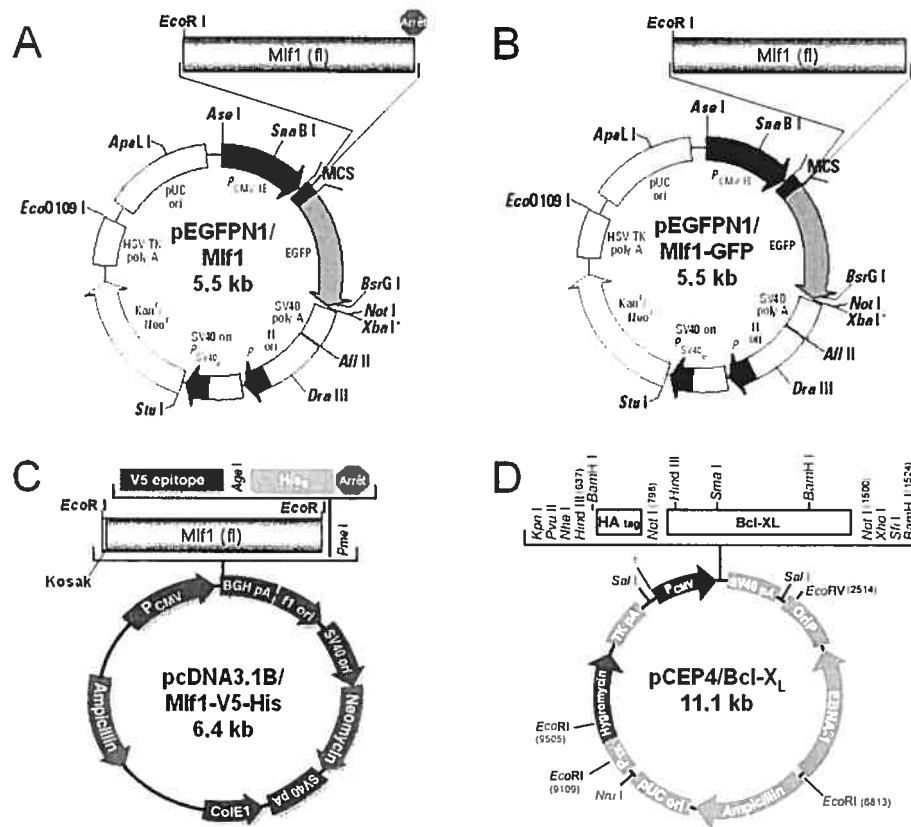


Figure 5 : Vecteurs d'expression contenant Mif1 ou Bcl-XL. A) Vecteur pEGFPN1/Mif1. B) Vecteur pEGFPN1/Mif1-GFP. C) Vecteur pcDNA3.1B/Mif1-V5-His. D) Vecteur pCEP4/Bcl-X<sub>L</sub>.

Pour ce qui est des clones qui avaient une croissance normale, nous avons effectué un transfert de type northern avec une sonde radioactive spécifique pour Mif1 (figure 6). Nous observons que l'expression de Mif1 pour trois clones ES/Mif1 (figure 6, puits 4, 5 et 6) est environ équivalente à l'expression endogène dans les cellules R1-ES (figure 6, puit 3). Ces résultats suggèrent que les clones non apoptotiques ne surexpriment pas Mif1 de façon significative. Considérant ces observations, nous avons émis l'hypothèse que la surexpression de Mif1 dans les cellules ES induit une apoptose de façon plus ou moins rapide. Toutefois, cette hypothèse n'a pu être vérifiée sur ces clones.

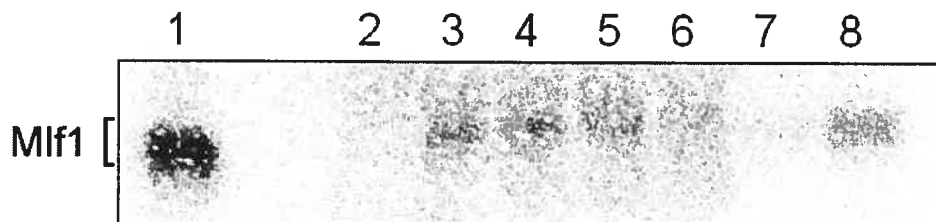


Figure 6 : Expression de Mlf1 dans les clones ES/Mlf1 non apoptotiques. Transfert de type northern avec une sonde radioactive spécifique à Mlf1. 1) Contrôle positif, 7µg d'ARN de cœur de souris. 2) Contrôle négatif, 10µg d'ARN de rate de souris. 3) 30µg d'ARN de cellules R1-ES. 4 à 6) 30µg d'ARN de trois différents clones ES/Mlf1. 7) Contrôle positif, 1µg d'ARN de cœur de souris. 8) Contrôle positif, 3µg d'ARN de cœur de souris.

### 3.1.2 Clonage moléculaire de Mlf1

Afin de vérifier l'hypothèse émise ci-dessus, nous avons voulu cloner Mlf1 dans un système inductible. Mlf1 ainsi cloné dans un vecteur inductible nous permettrait d'établir une lignée de cellules R1-ES possédant le transgène Mlf1 et par la suite de contrôler le moment d'activation de Mlf1. Pour ce faire, nous sommes passés par différentes étapes de clonage moléculaire précédant le clonage de Mlf1 dans le vecteur inductible. Premièrement, nous avons effectué une PCR avec l'enzyme *pfu* (Promega), qui offre une meilleure efficacité de polymérisation que la Taq ADN polymérase. Les amorces utilisées, spécifiques pour Mlf1, nous ont permis de modifier l'ADNc de Mlf1 en ajoutant des sites de restriction *EcoR* I en 5' et en 3', une séquence Kozak (Kozak, 1987) en amont de l'ATG et en enlevant le codon d'arrêt de Mlf1. Deuxièmement, le fragment obtenu suite au PCR a été cloné dans le vecteur pBluescript (Stratagene). Ce clonage nous a permis de confirmer, suite à un séquençage, que l'ADNc de Mlf1 ne comportait aucune erreur. Troisièmement, le fragment d'ADNc de Mlf1 a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3.1B/V5-His (Invitrogen). Ce clonage avait pour but d'obtenir un épitope (V5) nous permettant de détecter Mlf1 par immunofluorescence ou par transfert de type western. La construction pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His (figure 5C) a ainsi été obtenue. Finalement, le clonage de Mlf1-V5-His dans le vecteur inductible TetO-SB

(BD Biosciences Clontech) a été tenté. Toutefois, pour une raison inconnue, ce clonage n'a jamais réussi. N'ayant pu obtenir le vecteur inductible contenant Mlfl, nous avons essayé deux stratégies différentes afin d'obtenir un modèle cellulaire fonctionnel de surexpression de Mlfl à partir du vecteur pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His. En premier lieu, nous avons tenté d'établir le modèle cellulaire dans des cellules COS-7 avec le vecteur pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His (section 3.1.3). En deuxième lieu, nous avons essayé d'établir le modèle cellulaire dans les cellules R1-ES en surexprimant Mlfl avec le même vecteur et en surexprimant une protéine anti-apoptotique, soit Bcl-X<sub>L</sub> (humain) (Gross *et al.*, 1999) (section 3.1.4). En surexprimant Bcl-X<sub>L</sub> nous pensions pouvoir empêcher l'apoptose possiblement induite par Mlfl. Nous avons émis l'hypothèse qu'une surexpression de Mlfl requerrait un grand nombre de protéine 14-3-3 afin de séquestrer dans le cytoplasme ce surplus de Mlfl. L'augmentation de Mlfl dans la cellule déplacerait la liaison de BAD aux protéines 14-3-3 (voir figure 4B, voie endogène). BAD serait donc libéré conduisant à l'activation de l'apoptose.

### 3.1.2.1 Mutagenèse sur pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His

Parallèlement à l'établissement du modèle cellulaire, l'étude de la séquence par enzymes de restriction et séquençage de l'ADNc de Mlfl, obtenu de l'ARN de cœur d'une souris, nous a révélé la présence d'un exon supplémentaire (figure 2). Cet exon additionnel est situé entre l'exon 2 et l'exon 3 de Mlfl. La présence de cet exon supplémentaire, que nous avons nommé exon 3<sup>+</sup> (Ex3<sup>+</sup>), doit très certainement être due à un épissage alternatif. Un épissage alternatif de MLF1 humain a déjà été rapporté (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). Cet épissage alternatif conduit à la formation de quatre transcrits différents de MLF1. Pour ce dernier, l'épissage alternatif se produit entre l'exon 1 et l'exon 2 et il y a possibilité d'avoir un ou deux exons supplémentaires à cet endroit. Toutefois, selon les auteurs, seul le transcrit le plus court, c'est-à-dire sans exon supplémentaire, est capable de donner une protéine fonctionnelle, puisque chacun des deux exons supplémentaires a pour effet d'introduire un codon d'arrêt au tout début de l'ARN messager. En ce qui nous concerne, il semble que Mlfl possédant l'exon 3<sup>+</sup> est capable de produire une protéine fonctionnelle (voir figures 7, 14 et 16). De plus, les deux formes de Mlfl,

forme courte (fc) et longue (fl), sont répertoriées dans la base de données « Gene Bank » (PubMed), mais c'est la forme courte qui est rapportée lors d'étude sur Mlf1 murin (Hitzler *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999). La forme longue de Mlf1 murin a été rapportée dans le cadre d'une étude sur plus de 15 000 ADNc humain et murin de longueur totale (Strausberg *et al.*, 2002). Nous avons donc voulu savoir s'il pouvait exister une différence fonctionnelle entre les deux formes de Mlf1. Pour ce faire nous avons eu recours à la mutagenèse. Notre première interrogation était de savoir si l'exon 3<sup>+</sup> supplémentaire pouvait empêcher la localisation nucléaire de Mlf1 sous forme de foci nucléaires tel qu'observé par Williams *et al.* (1999). Deuxièmement, afin de s'assurer de la localisation nucléaire de Mlf1 nous avons ajouté un signal de localisation nucléaire (NLS) à Mlf1. Nous avons donc effectué différentes mutagenèses sur le plasmide pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His. D'abord, nous avons enlevé les 45 paires de bases de l'exon 3<sup>+</sup> à l'aide d'amorces spécifiques, ce qui nous a donné la construction pcDNA3.1B/Mlf1ΔEx3<sup>+</sup>-V5-His. Suite à la mutagenèse, la construction a été vérifiée par séquençage. Le résultat du séquençage a montré que la mutagenèse avait bien fonctionné et que nous avons maintenant le même ADNc que celui retrouvé dans la littérature (Hitzler *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999). Ensuite, nous avons ajouté un NLS à Mlf1 immédiatement après le codon d'initiation de traduction (ATG). Le NLS utilisé correspond à la séquence nucléotidique du premier NLS de la protéine NPM (figure 2). Nous avons utilisé le NLS de NPM parce qu'il a été suggéré que ce dernier serait impliqué dans la localisation nucléaire de NPM-MLF1 dans les cas de MDS (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). Nous avons donc obtenu la construction pcDNA3.1B/NLS-Mlf1-V5-His. Enfin, nous avons effectué la double mutagenèse qui nous a donné la construction pcDNA3.1B/NLS-Mlf1ΔEx3<sup>+</sup>-V5-His. Une fois ces trois constructions obtenues, elles ont été transfectées de façon transitoire dans des cellules COS-7 (figure 7). Les résultats montrent une localisation cytoplasmique pour les protéines obtenues d'après les vecteurs produits par mutagenèse (figure 7B, C et D) ainsi que pour celles codées par le vecteur non muté pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His (figure 7A). En somme, ces résultats tendent à démontrer que l'exon supplémentaire n'influence pas la localisation cellulaire de

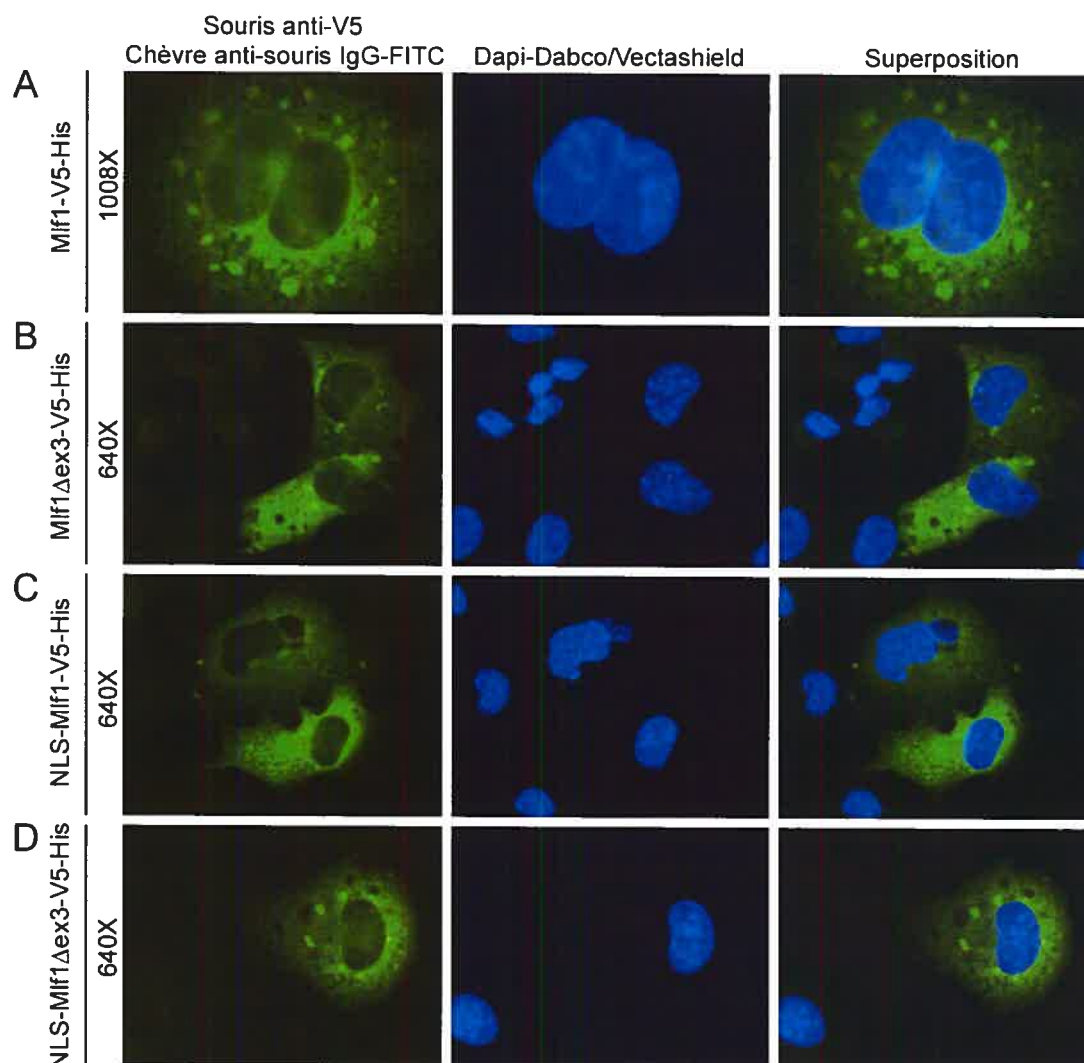


Figure 7 : Localisation cellulaire de Mif1 et des mutants Mif1 dans les cellules COS-7. La transfection transitoire des cellules COS-7 par électroporation avec le vecteur pcDNA3.1B/Mif1-V5-His (A) et les vecteurs obtenus par mutagenèse dirigée : pcDNA3.1B/Mif1ΔEx3<sup>+</sup>-V5-His (B), pcDNA3.1B/NLS-Mif1-V5-His (C) et pcDNA3.1B/NLS-Mif1ΔEx3<sup>+</sup>-V5-His (D). Dans tous les cas, nous observons une localisation cytoplasmique de Mif1 suite au marquage des cellules avec l'anticorps contre V5 (souris anti-V5) et de l'anticorps secondaire conjugué au FITC (chèvre anti-souris IgG-FITC) (vert). Les noyaux ont été colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). La superposition des deux marquages est également montrée.

Mlf1. Toutefois une question demeure : pourquoi n'observons-nous pas la localisation nucléaire tel que rapporté par Williams *et al.* (1999) lorsque nous utilisons la construction pcDNA3.1B/Mlf1 $\Delta$ Ex3<sup>+</sup>-V5-His? Ces résultats montrent également que les constructions où un NLS a été ajouté à Mlf1 ne montre pas de localisation nucléaire.

### 3.1.3 Transfection de cellules COS-7 avec pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His

L'essai dans les COS-7 était basé sur le fait que Williams *et al.* (1999) avaient observé une localisation cytoplasmique et sous forme de foci nucléaire de Mlf1. Leur expérience a été effectuée en utilisant des cellules COS-7 et en utilisant une construction sensiblement identique à celle que nous avons produite. Nous avons donc voulu répéter cette expérience, mais au lieu de transfecter de façon transitoire, nous avons effectué une transfection stable avec pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His pour ainsi obtenir des clones de cellules COS-7 exprimant Mlf1-V5-His. Il est à noter que les cellules COS-7 expriment Mlf1 de façon endogène, mais à un très faible niveau. Nous avons donc obtenu différents clones COS-7/pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His (COS-7/Mlf1-V5-His) et une population mixte (mélange volontaire de quelques clones non repiqués). Lors de la caractérisation, nous avons observé par PCR que sur huit clones COS-7/Mlf1-V5-His isolés, seulement deux semblaient avoir incorporé dans leur génome le transgène Mlf1. La population mixte s'est également révélée positive pour le transgène. Ensuite, l'expression de Mlf1-V5-His a été vérifiée par RT-PCR. Sur les deux clones possédant le transgène, un seul clone ainsi que la population mixte exprimaient le transgène Mlf1-V5-His. Puis, par immunofluorescence nous avons observé des cellules positives pour Mlf1-V5-His pour la population mixte seulement (données non montrées). Toutefois, le pourcentage de cellules positives était très faible (environ 1%). Ce qui peut être dû à la limite de détection de la technique ou bien, au fait qu'une surexpression appréciable de MLF1 soit létale. Williams *et al.* (1999) ont rapporté dans leur étude que les niveaux de Mlf1 endogène étaient trop faible pour être détecté par immunofluorescence indirecte en microscopie confocale dans les cellules J2E-m2 et M1, et ce, même dans des cellules J2E et M1 produisant Mlf1 de façon rétrovirale. Il



est possible que le même phénomène qui s'est produit lors des transfections par rétrovirus de Williams *et al.* (1999) se soit répété lors de nos études dans les cellules COS-7. Comme les résultats n'étaient pas concluants suite à la transfection stable des COS-7, nous nous sommes tournés vers la transfection transitoire. La figure 16 montre la localisation cellulaire de Mlfl-V5-His suite à l'électroporation des cellules COS-7 avec pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His. Nous avons observé une localisation cytoplasmique sous forme de foci plus ou moins gros. Nous pouvons également voir dans certains cas une localisation péri-nucléaire. (Voir section 3.2.3 pour l'analyse plus approfondie des résultats.)

### **3.1.4 Transfection stable de cellules R1-ES avec pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His et pCEP4/Bcl-X<sub>L</sub>**

La surexpression d'une molécule anti-apoptotique, tel que Bcl-X<sub>L</sub>, est un moyen très utilisé dans la littérature (Yoneda-Kato *et al.*, 1999) qui permet de contrecarrer des mécanismes menant à l'apoptose. Parmi ceux-ci, on retrouve les mécanismes activés lors de stress cellulaire ou lors d'une exposition à des facteurs extra ou intracellulaires. Ainsi, nous avons choisi de cosurexprimer Mlfl-V5-His et Bcl-X<sub>L</sub> dans les cellules R1-ES, parce que précédemment nous avons observé de l'apoptose dans nos cellules. Nous avons procédé à la transfection stable par électroporation des plasmides pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His (figure 5C) et pCEP4/Bcl-X<sub>L</sub> (vecteur gracieusement fourni par le Dr Richard Bertrand (Schmitt *et al.*, 1998)) (figure 5D). Après une sélection des cellules au G418, nous avons isolé 30 clones. La sélection au G418 nous permet d'identifier seulement les clones ayant incorporé dans leur génome le plasmide pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His, puisque le plasmide pCEP4/Bcl-X<sub>L</sub> contient le gène de résistance à l'hygromicine. Toutefois, la co-intégration des vecteurs dans les cellules a été favorisée en électroporant les vecteurs dans un rapport de concentration 1 : 5 (pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His : pCEP4/Bcl-X<sub>L</sub>). Lors de l'expansion des clones ES, nous n'avons pas perdu de clone par apoptose. D'après cette observation, nous avons d'abord caractérisé l'expression des deux transgènes par RT-PCR. Premièrement, avec des amorces spécifiques pour Mlfl, nous avons déterminé que 25 clones sur 30 exprimaient le transgène Mlfl-V5-His et deuxièmement, avec des amorces spécifiques pour Bcl-X<sub>L</sub>, nous avons déterminé que 4 clones sur 30

étaient positifs pour l'expression de ce transgène (données non montrées). Nous avons donc sélectionné parmi les 30 clones les quatre qui exprimaient les deux transgènes soit les clones ES/Mlf1-V5-His/Bcl-X<sub>L</sub> et deux clones qui exprimaient seulement le transgène Mlf1-V5-His soit les clones ES/Mlf1-V5-His.

À l'aide des clones obtenus, nous avons entrepris une étude de l'apoptose des cellules en comparant les clones ES/Mlf1-V5-His/Bcl-X<sub>L</sub> aux clones ES/Mlf1-V5-His ainsi qu'avec des cellules R1-ES. Nous avons vérifié les niveaux d'apoptose des cellules par deux différentes techniques. La première technique se base sur les propriétés biochimiques de l'Annexine-V qui est une protéine calcium-dépendante liant les phospholipides avec une forte affinité pour les phosphatidylsérines. L'Annexine-V lie donc de façon rapide et sélective les phosphatidylsérines qui se retrouvent à la face extérieure de la membrane cellulaire au tout début du processus de l'apoptose (BioSource, fiche technique de l'Annexine-V). La deuxième technique utilisée pour mesurer l'apoptose est l'essai TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling). Cette technique mesure les cassures simple- et double-brin se produisant au cours du processus de l'apoptose en ajoutant par une réaction enzymatique des dUTPs, marqués d'un fluorophore, aux sites de cassure dans l'ADN (BD Biosciences et Roche, fiche technique de la trousse TUNEL). Les analyses des résultats obtenus suite au marquage à l'Annexin-V et avec l'essai TUNEL n'ont pas démontré de différence significative des niveaux de cellules apoptotiques lorsque l'on compare les différents types cellulaires entre eux, soit les clones ES/Mlf1-V5-His/Bcl-X<sub>L</sub>, les clones ES/Mlf1-V5-His et les cellules R1-ES (données non montrées). Il est possible que les 6 clones choisis pour cette partie de l'étude n'exprimaient pas suffisamment Mlf1 pour induire l'apoptose.

Nous avons ensuite poursuivi l'analyse des clones ES/Mlf1-V5-His/Bcl-X<sub>L</sub> et ES/Mlf1-V5-His en effectuant une analyse du cycle cellulaire. Nous avons voulu voir si Mlf1 avait une influence sur le cycle cellulaire des clones ES puisque Winteringham *et al.* (2004) ont démontré, tel que mentionné en introduction (section 1.3.4), un lien entre Mlf1 et l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>Kip1</sup>. Les profils du cycle cellulaire des clones ES/Mlf1-V5-His/Bcl-X<sub>L</sub> et ES/Mlf1-V5-His ainsi que celui des cellules R1-ES ont été analysés suite à une coloration de l'ADN des cellules

à l'iodure de propidium (PI : « propidium iodide »). Toutefois, aucune différence marquante n'a pu être révélée entre les différents clones ES et les cellules R1-ES (données non montrées). Enfin, un essai de différenciation des cellules ES vers la lignée érythroïde a été tenté. Encore un fois aucune différence n'a été remarquée entre les clones ES/Mlf1-V5-His/Bcl-X<sub>L</sub>, les clones ES/Mlf1-V5-His et les cellules R1-ES, et ce, tant au niveau du nombre et de la taille des EBs qu'au niveau des colonies obtenues en méthylcellulose.

Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de la protéine transgénique Mlf1-V5-His est insuffisant dans tous les clones étudiés. En effet, bien que la sélection au G418 et la RT-PCR nous indique que les cassettes d'expression sont bien intégrées dans le génome des cellules R1-ES, les méthodes conventionnelles de détection protéique (transfert de type western et immunofluorescence) n'ont pas permis de détecter la protéine Mlf1-V5-His. Le fait que nous n'obtenions que des clones ayant une faible expression de Mlf1-V5-His peut s'expliquer par l'observation mentionnée précédemment, c'est-à-dire qu'un nombre significatif de clones ES/Mlf1 vont rapidement en apoptose. Ce phénomène serait causé par la forte surexpression de Mlf1.

### **3.1.5 Mutagenèse pour obtenir la protéine de fusion Mlf1-GFP**

Afin de pouvoir détecter Mlf1 directement nous avons créé la protéine de fusion Mlf1-GFP. Pour ce faire, nous avons effectué une mutagenèse sur le plasmide pEGFPN1/Mlf1 (figure 5A). Comme nous l'avons dit plutôt, le gène EGFP contenu dans le vecteur n'est pas traduit à cause du codon d'arrêt de Mlf1. Pour la mutagenèse, nous avons utilisé des amorces spécifiques qui nous ont permis d'enlever le codon d'arrêt et de fusionner EGFP à Mlf1 dans le même cadre de lecture. Nous avons donc obtenu la construction pEGFPN1/Mlf1-GFP (figure 5B). Le vecteur obtenu a été analysé par digestions enzymatiques et par séquençage. Les résultats obtenus nous ont indiqués que la mutagenèse avait bien fonctionné (codon d'arrêt enlevé, bon cadre de lecture et aucune erreur introduite dans la séquence).

### 3.1.6 Transfection stable de cellules R1-ES avec pEGFPN1/Mifl-GFP

Dans nos tentatives d'établir un modèle cellulaire fonctionnel et facilement caractérisable, nous avons tenté cette fois-ci de transfecter de façon stable les cellules R1-ES avec le vecteur obtenu suite à la mutagenèse, soit pEGFPN1/Mifl-GFP. Nous avons également transfecté, en guise de contrôle, des cellules R1-ES avec le vecteur pEGFP-N1. Les transfections ont été réalisées par électroporation et suite à la sélection des cellules au G418, nous avons isolé 16 clones ES/pEGFPN1/Mifl-GFP (ES/Mifl-GFP) et 7 clones ES/pEGFP-N1 (ES/EGFP). Tous les clones ont été analysés en cytométrie en flux afin de déterminer leur niveau d'expression de Mifl-GFP ou EGFP. Suite à cette première analyse, nous avons sélectionné quatre clones ES/Mifl-GFP, soit les clones #3, #13, #15 et #16, et deux clones ES/EGFP, soit les clones #3 et #4, pour la suite des expériences puisqu'ils exprimaient leur transgène respectif à différents niveaux (figure 9A, jour 1). Par la suite, nous avons entrepris la caractérisation de ces clones.

Premièrement, nous avons vérifié l'expression de Mifl dans les clones par RT-PCR. Avec des amorces internes spécifiques à Mifl, nous avons déterminé, tel qu'attendu, que les clones ES/Mifl-GFP, les clones ES/EGFP et les cellules R1-ES exprimaient Mifl endogène (figure 8A, bandes inférieures). Nous avons également déterminé que les quatre clones ES/Mifl-GFP (#3, #13, #15 et #16) exprimaient le transgène Mifl (figure 8A, bandes supérieures). L'ADNc de Mifl contenu dans le plasmide pEGFPN1/Mifl-GFP est celui qui possède l'exon3<sup>+</sup>, c'est pourquoi nous observons une bande de taille légèrement supérieure pour Mifl transgénique.

Deuxièmement, nous avons caractérisé les clones par transfert de type western. À la figure 8B, nous pouvons voir que les clones ES/EGFP #3 et #4 expriment la protéine EGFP (26.9 kDa) fortement. Nous pouvons également voir que les clones ES/Mifl-GFP #3, #13, #15 et #16 expriment la protéine de fusion Mifl-GFP (62.5 kDa), mais de façon beaucoup moins importante que les clones contrôles ES/EGFP.

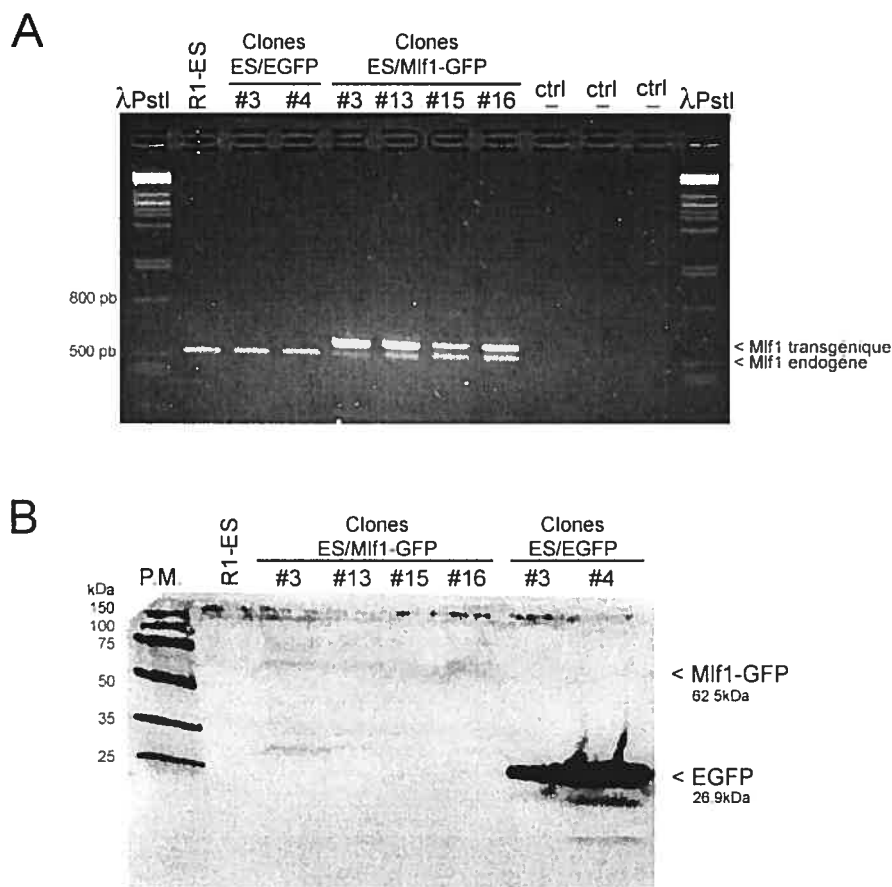


Figure 8 : Caractérisation des clones ES/Mif1-GFP et ES/EGFP. A) ARN de cellules R1-ES, de clones ES/Mif1-GFP et ES/EGFP soumis à une RT-PCR avec une seule paire d'amorces amplifiant à la fois Mif1 endogène et transgénique. B) Extrait total de protéines de cellules R1-ES, de clones ES/Mif1-GFP et ES/EGFP soumis à un transfert de type western avec l'anticorps de souris anti-GFP, suivi de l'anticorps de chèvre anti-souris IgG HRP et révélé avec le système ECLplus. λPst I : marqueur de poids moléculaire; ctrl - : contrôle négatif (eau de DNaseI, de RT et de PCR); P.M. : marqueur de poids moléculaire protéique conjugué à la peroxydase.

Finalement, nous avons suivi en cytométrie en flux les clones ES/Mif1-GFP et ES/EGFP sur une période de 55 jours (figure 9A). Ces résultats suggèrent que l'expression des transgènes EGFP et Mif1-GFP est relativement stable dans le temps. Les cellules R1-ES ne sont pas montrées sur le graphique pour des raisons de clarté, mais notons qu'elles n'ont montré aucune cellule GFP positive tout au long de l'expérience. La figure 9B montre un exemple d'une analyse en cytométrie en flux,

soit le jour 22 du graphique en 9A. Nous observons que les clones ES/Mlfl-GFP ont une faible expression du transgène Mlfl-GFP (#3 = 12,8%, #13 = 11,1%, #15 = 0,03% et #16 = 7,2%) comparativement aux clones ES/EGFP (#3 = 66,2% et #4 = 87,6%). Nous avons observé également que l'intensité de fluorescence est beaucoup plus faible pour les clones ES/Mlfl-GFP par rapport aux clones contrôles; ceci se compare avec l'échelle logarithmique des diagrammes de cytométrie en flux. Nous avons donc une intensité de fluorescence de l'ordre de  $10^1$  pour les clones ES/Mlfl-GFP et une intensité autour de  $10^2$  pour ES/EGFP #3 et autour de  $10^3$  pour ES/EGFP #4.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus pour les expériences avec Mlfl-GFP (et EGFP) sont cohérents. D'abord, en comparant le transfert de type western (figure 8B) et l'analyse en cytométrie en flux (figure 9A-B) nous voyons dans les deux expériences une accumulation plus importante de protéines EGFP pour le clone ES/EGFP #4 que pour le #3. Pour ce qui est des clones ES/Mlfl-GFP, la détection faible de la protéine de fusion Mlfl-GFP en western est confirmée par l'analyse de cytométrie en flux. Enfin, en considérant Mlfl endogène comme contrôle interne de la RT-PCR (figure 8A), nous observons que les ratios Mlfl transgénique par rapport à l'endogène des clones ES/Mlfl-GFP #3, #13, #15 et #16 varient. Nous pouvons classer les ratios transgénique/endogène obtenus par RT-PCR en ordre décroissant comme suit : clones ES/Mlfl-GFP #3 > #13 > #16 > #15. Cet ordre de classement s'avère être le même si nous regardons le pourcentage moyen de détection de la protéine Mlfl-GFP obtenu lors de l'analyse de cytométrie en flux (figure 9A).

Suite à ces derniers résultats, nous pouvons affirmer que nous avons établi un modèle cellulaire fonctionnel. En effet, les clones ES exprimant Mlfl-GFP sont viables et nous pouvons détecter directement, par cytométrie en flux, et indirectement, par western, RT-PCR et immunofluorescence (section 3.2.3), les cellules exprimant la protéine Mlfl-GFP.

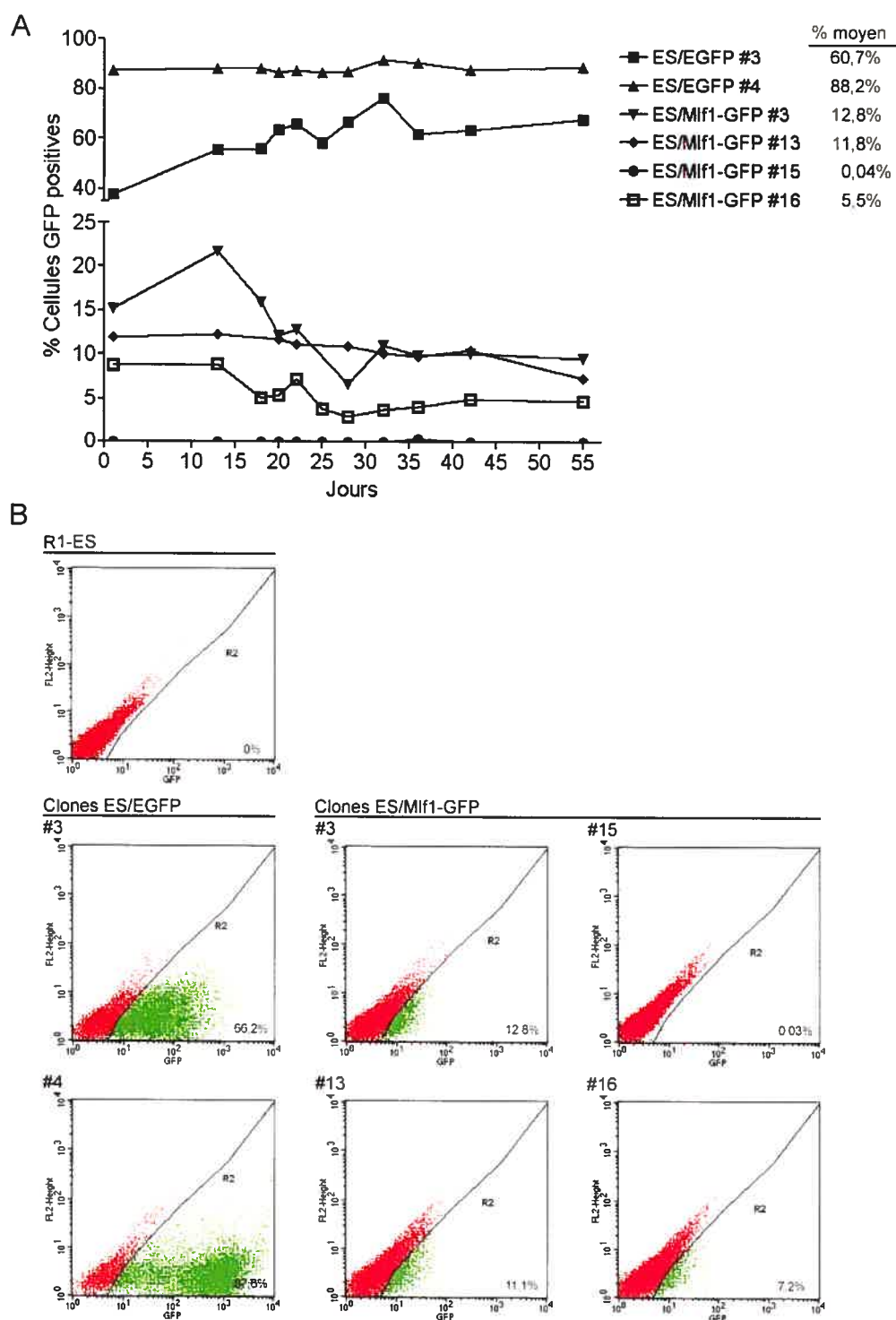


Figure 9 : Analyse en cytométrie en flux des clones ES/Mif1-GFP et ES/EGFP. A) Les cellules des différents clones ont été récoltées et resuspendues dans du PBS pour ensuite être analysées en cytométrie en flux afin de connaître leur pourcentage de cellules GFP positives. L'analyse a été effectuée de façon routinière sur une

période de 55 jours. B) Exemple représentatif d'une analyse en cytométrie en flux correspondant au jour 22 du graphique présenté en A. Les régions (R2) ont été dessinées par rapport au contrôle de cellules R1-ES. Rouge : cellules GFP négatives; vert : cellules GFP positives.

---

### **3.2 Étude et caractérisation des mécanismes moléculaires dans lesquels Mlf1 est impliqué**

À l'aide du modèle cellulaire décrit précédemment (section 3.1.6), nous avons entrepris d'étudier et de caractériser les mécanismes moléculaires dans lesquels Mlf1 pourrait être impliqué.

#### **3.2.1 Tri cellulaire sur le clone ES/Mlf1-GFP #3**

Tout d'abord, comme les clones ES/Mlf1-GFP n'exprimaient pas Mlf1-GFP à de forts niveaux, nous avons effectué un tri cellulaire sur un des clones afin d'en isoler les cellules GFP positives. Suite au tri cellulaire, les cellules GFP positives ainsi que les GFP négatives ont été remises en culture. Le tri cellulaire a été répété à deux reprises sur le clone ES/Mlf1-GFP #3; ce clone a été choisi parce qu'il est un des clones ES/Mlf1-GFP possédant le nombre le plus élevé de cellules GFP positives (figure 9A). Suite aux deux tris cellulaires, nous avons augmenté le nombre de cellules GFP positives dans le clone ES/Mlf1-GFP #3 à 57,1%, dans un premier temps, et à 44,0%, dans un deuxième temps. Puis, les variations de l'expression de la protéine Mlf1-GFP (nombre de cellules GFP positives) ont été suivies au cours du temps (figure 10). Puisque l'expression des transgènes est plutôt stable dans le temps (voir figure 9A), nous nous attendions à un résultat semblable dans cette expérience, c'est-à-dire que les pourcentages de cellules positives obtenus suite au tri cellulaire demeurent constants. Ce que nous avons plutôt observé est que les pourcentages de cellules GFP positives (figure 10, ■) tendaient à retourner rapidement à un niveau similaire à celui que nous avions avant le tri, soit environ 10%. Le même phénomène c'est produit pour ce qui est des cellules GFP négatives (figure 10, ▲); elles sont passées de 0% à 5-10% de cellules GFP positives.



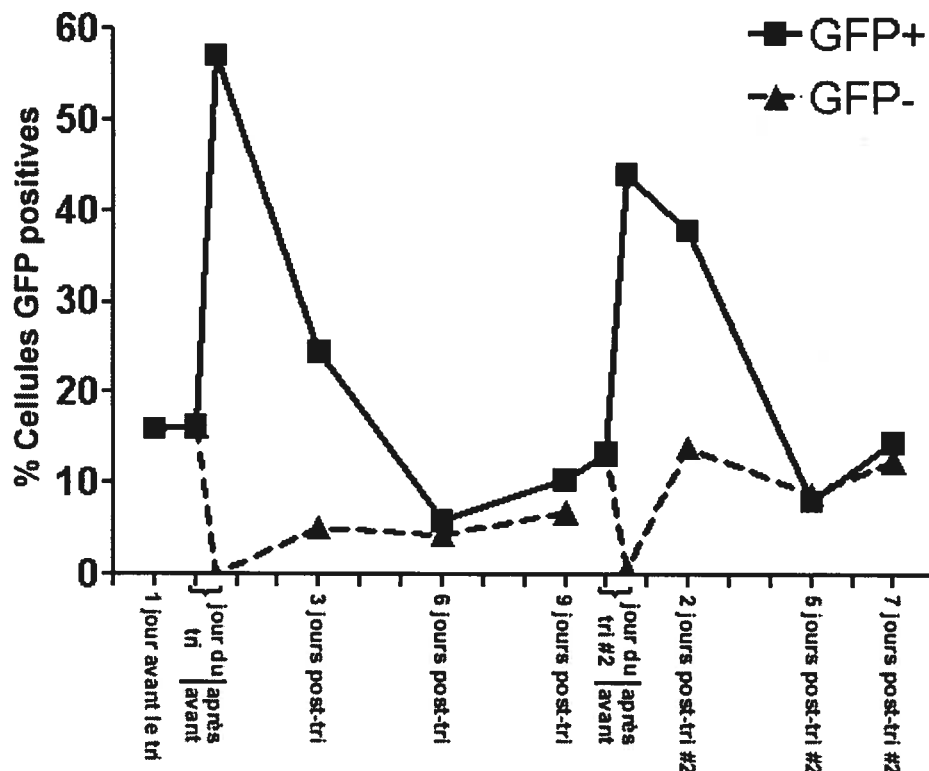


Figure 10 : Tris cellulaires sur le clone ES/Mif1-GFP #3 et les variations du nombre de cellules GFP positives au cours du temps. Les cellules du clone ES/Mif1-GFP #3 ont été triées à deux reprises afin d'en isoler les cellules GFP positives et négatives. Suite aux tris, les cellules ont été remises en culture puis, elles ont été analysées en cytométrie en flux de façon routinière, tous les 2 à 3 jours, afin de vérifier le pourcentage de cellules GFP positives.

### 3.2.2 Analyse du cycle cellulaire des clones ES/EGFP

Par la suite, nous avons vérifié l'influence de l'expression de Mif1 sur le cycle cellulaire des cellules ES. Nous avons donc analysé, par un marquage au PI, le cycle cellulaire des cellules du clone ES/Mif1-GFP #3 avant et après le tri cellulaire et nous avons également analysé des cellules R1-ES comme contrôle. À la figure 11A et B sont présentés les résultats obtenus; la partie B est en fait la représentation graphique des valeurs obtenues pour chaque phase du cycle cellulaire en A (l'intégration des aires a été effectuée avec le programme « ModFit »). Nous observons donc une

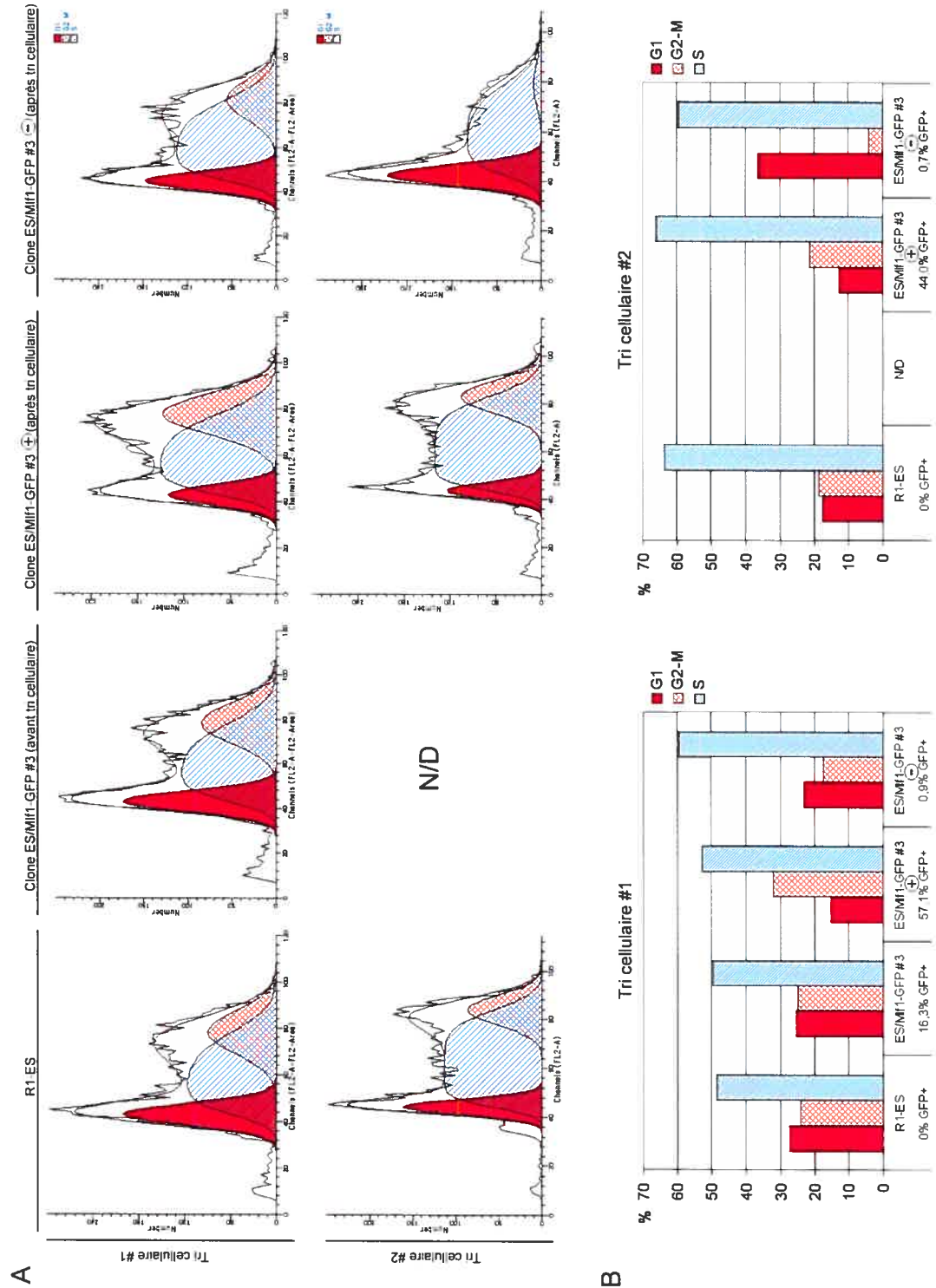


Figure 11 : Analyse du cycle cellulaire du clone ES/Mif1-GFP #3 trié. A) Les différentes populations de cellules : R1-ES, ES/Mif1-GFP #3 avant le tri et ES/Mif1-GFP #3 triées pour les cellules GFP positives (+) et négatives (-), ont été fixées à

l'éthanol puis, marquées au PI. L'acquisition des données a été effectuée en cytométrie en flux et l'analyse des données a été faite à l'aide du programme « ModFit » qui donne le profil du cycle ainsi que la proportion de cellules dans chaque phase sous forme de l'aire sous la courbe. B) Représentation sous forme d'histogramme des valeurs de chacune des phases du cycle cellulaire obtenues en A pour les différentes populations de cellules. Rouge : nombre de cellules en phase G1; quadrillé rouge : nombre de cellules en phase G2-M; lignée bleue : nombre de cellules en phase S; N/D : données non disponibles.

---

variation dans les profils de cycle cellulaire du clone ES/Mlfl-GFP #3 d'après deux différents tris. Lorsque nous comparons les profils de cycle des cellules ES/Mlfl-GFP #3 (+) après le tri cellulaire (figure 11A, tri #1 et #2) par rapport au profil des cellules ES/Mlfl-GFP #3 avant le tri cellulaire (figure 11A, tri #1) ainsi que par rapport aux profils des cellules R1-ES (figure 11A, tri #1 et #2), nous observons une certaine augmentation de nombre de cellules en G2-M. À la figure 11B, nous observons de façon plus précise que le ratio G1/G2-M varie dans les différentes populations de cellules. Pour les cellules R1-ES (figure 11B, tri #1 et #2) ainsi que pour les cellules ES/Mlfl-GFP #3 (figure 11B, tri #1), nous observons que le ratio entre G1 et G2-M est d'environ 1. Par contre, pour les cellules ES/Mlfl-GFP #3 (+) (figure 11B, tri #1 et #2) nous observons pratiquement deux fois plus de cellules en G2-M que de cellules en G1. Toutefois, en soumettant les cellules ES/Mlfl-GFP #3 (-) (figure 11A et B, tri #1 et #2) aux mêmes comparaisons, nous observons un pourcentage de cellules en G2-M inférieur au pourcentage de cellules en G1. Donc lorsque nous séparons le clone ES/Mlfl-GFP #3 en deux populations (cellules GFP+ et GFP-), nous observons une variation du pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle, ce qui nous porte à croire que Mlfl pourrait être régulé au niveau de la traduction de façon cycle cellulaire spécifique ce qui résulterait en l'accumulation de la protéine Mlfl-GFP en G2-M.

### 3.2.3 Localisation cellulaire de Mlf1

Tel qu'abordé précédemment, nous avons observé une localisation cytoplasmique de Mlf1. Nous avons donc entrepris de mieux caractériser cette localisation. Pour ce faire, nous avons analysé deux aspects différents, soit l'influence de l'étiquette fusionnée à Mlf1 et les types cellulaires utilisés.

Premièrement, nous avons voulu savoir si les deux différentes étiquettes utilisées pour détecter Mlf1, soit V5 et EGFP, pouvaient avoir une influence sur la localisation cellulaire observée. En effet, l'ajout d'un épitope ou la formation d'une protéine fusion peut influencer le bon repliement d'une protéine de fusion et ainsi modifier sa fonctionnalité et sa localisation dans la cellule (Wang et Chong, 2003). Nous avons donc transfecté de façon transitoire (FuGene6, Roche) des cellules R1-ES séparément avec le vecteur pEGFPN1/Mlf1-GFP (figure 12) et avec pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His (figure 14). Nous avons observé, pour les deux vecteurs, une localisation cellulaire similaire dans les cellules ES, c'est-à-dire que Mlf1 se retrouve au cytoplasme sous forme de foci plus ou moins gros. Cette localisation semble être spécifique à Mlf1, puisqu'en comparant la localisation de Mlf1-GFP (figure 12) par rapport au contrôle de cellules R1-ES transfectées transitoirement avec pEGFP-N1 (figure 13), nous observons des localisations très différentes des deux protéines. Dans le cas des cellules R1-ES/pEGFP-N1, nous observons une localisation de EGFP tant cytoplasmique que nucléaire (figure 13), alors que les cellules R1-ES/pEGFPN1/Mlf1-GFP ne semble pas montrer de localisation nucléaire (figure 12). À la figure 14, nous voyons également que la détection est spécifique à Mlf1-V5-His puisque le contrôle de cellules R1-ES (rangée du haut) ne révèle aucune cellule V5 positive. En somme, le patron de localisation de Mlf1-GFP est très semblable à celui de Mlf1-V5-His. Deuxièmement, nous avons voulu savoir si le type cellulaire utilisé pouvait avoir un effet sur la localisation. Nous avons donc vérifié la localisation de Mlf1 suite à la transfection transitoire de cellules COS-7 avec le contrôle pEGFP-N1 et pEGFPN1/Mlf1-GFP (figure 15A et B respectivement) et avec pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His (figure 16). Encore une fois nous avons obtenu la même localisation cellulaire de Mlf1 (décrite précédemment), c'est-à-dire des foci cytoplasmiques.

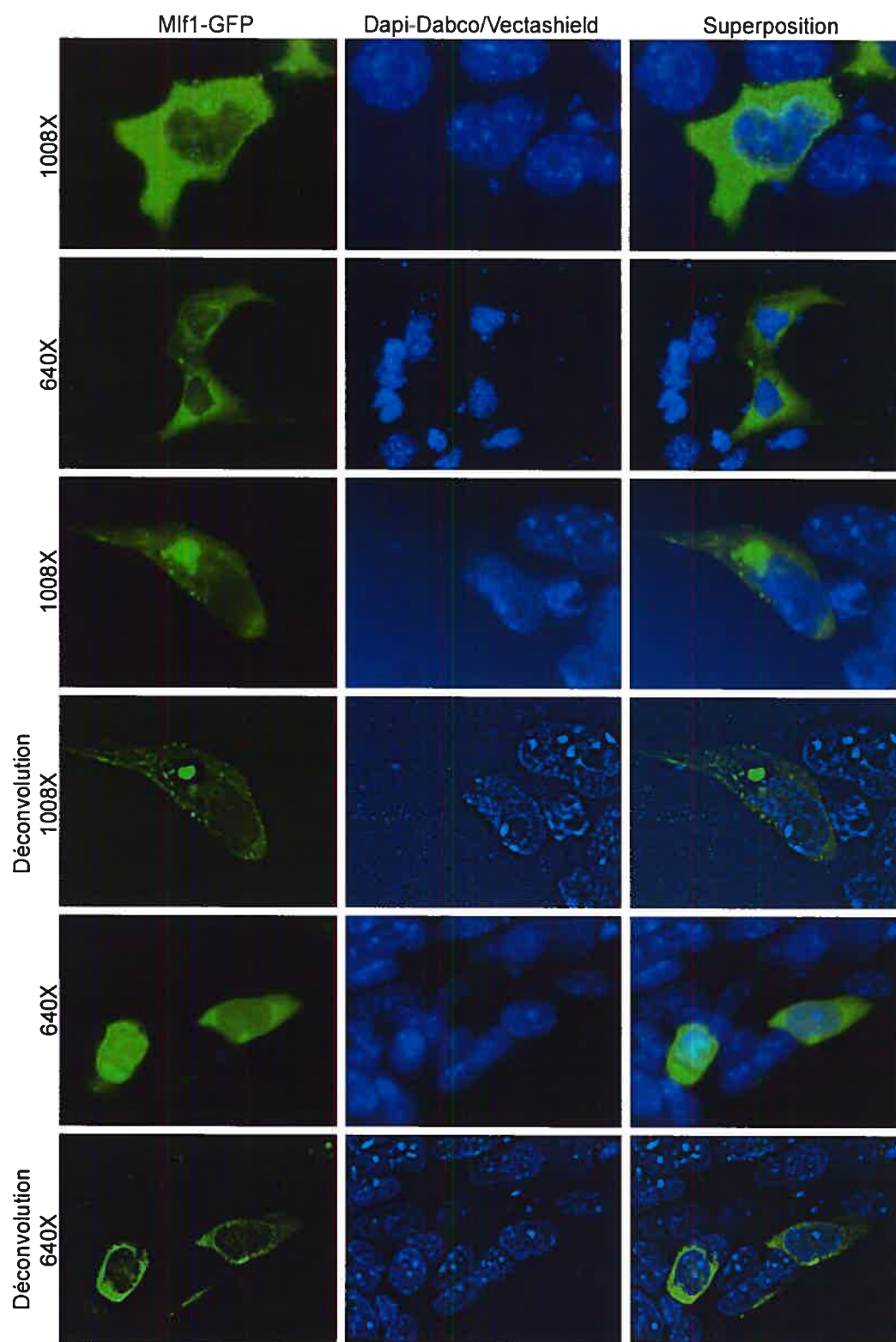


Figure 12 : Localisation cellulaire de Mif1-GFP dans les cellules R1-ES. (Légende voir page 58)

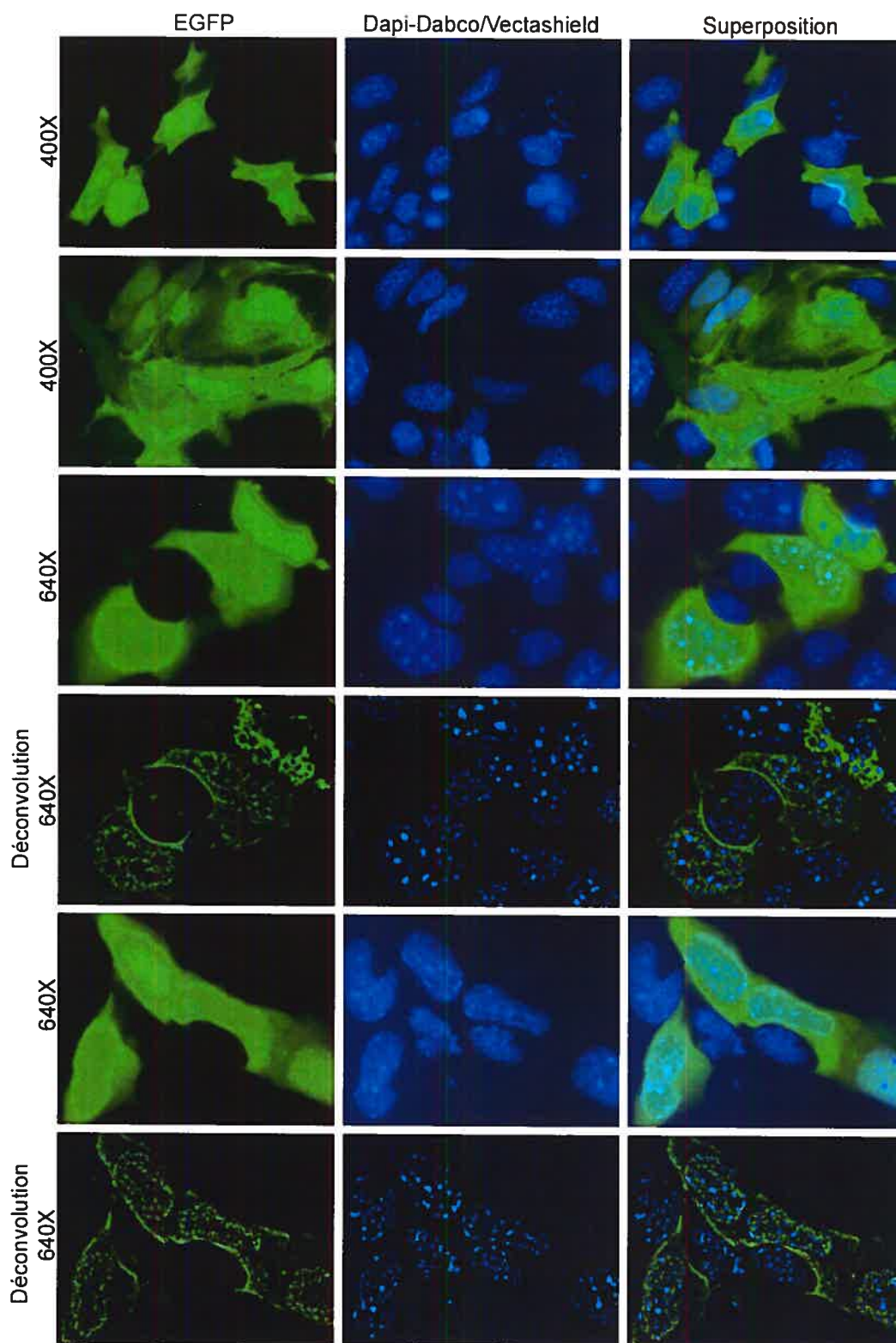


Figure 13 : Localisation cellulaire de EGFP dans les cellules R1-ES. (Légende voir page 58)



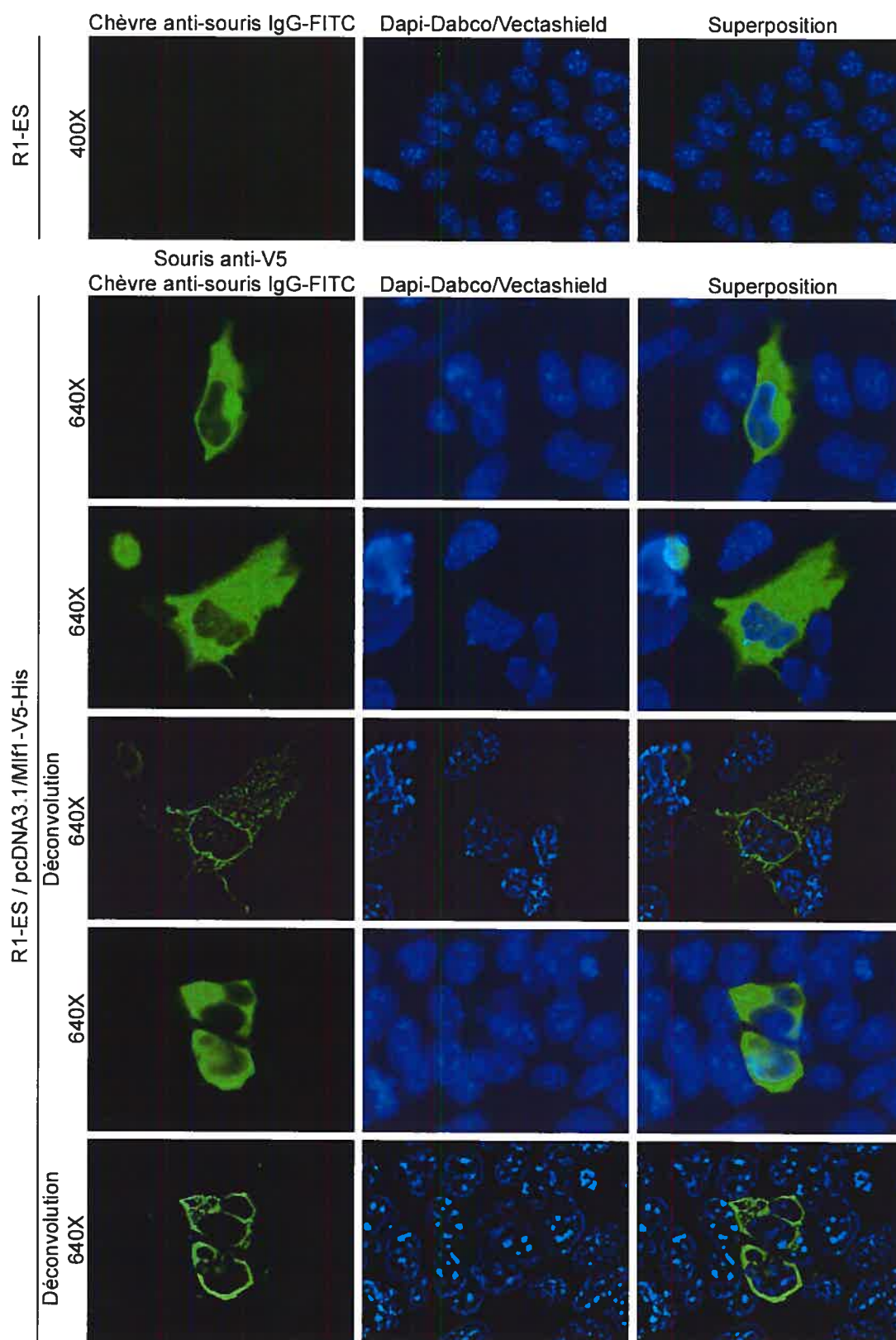


Figure 14 : Localisation cellulaire de Mif1-V5-His dans les cellules R1-ES.  
(Légende voir page 58)

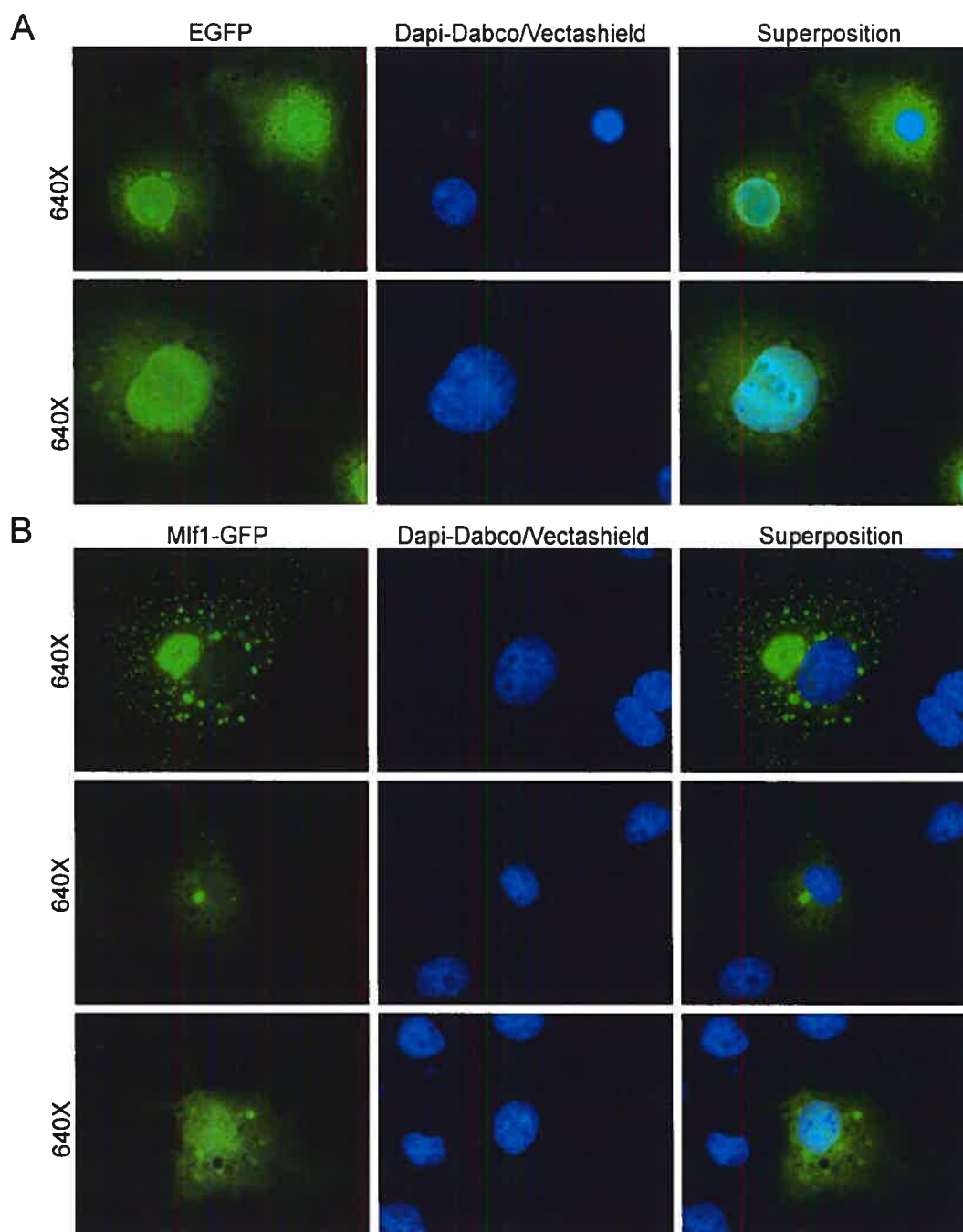


Figure 15 : Localisation cellulaire de EGFP et Mif1-GFP dans les cellules COS-7. Transfection transitoire par électroporation de cellules COS-7 avec les vecteurs pEGFP-N1 (A) et pEGFPN1/Mif1-GFP (B). (Légende voir page 58)



---

Figure 12 (page 54) : Localisation cellulaire de Mlfl-GFP dans les cellules R1-ES. Les cellules ont été cultivées directement sur lame et la transfection transitoire des cellules R1-ES avec le vecteur pEGFPN1/Mlfl-GFP a été effectuée avec le FuGene6 (Roche). La localisation cytoplasmique de Mlfl-GFP (vert) est montrée pour différentes cellules. Les lames ont été visualisées directement suite à une coloration des noyaux au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). La déconvolution avec le programme « OpenLab » a été effectuée dans deux cas, tel qu'indiqué. La superposition des deux fluorescences est également montrée.

---

Figure 13 (page 55) : Localisation cellulaire de EGFP dans les cellules R1-ES. Les cellules ont été cultivées directement sur lame. Les localisations cytoplasmique et nucléaire de EGFP (vert) sont montrées suite à la transfection transitoire (FuGene6, Roche) des cellules R1-ES avec le vecteur pEGFP-N1, suivie d'une coloration des noyaux au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). La déconvolution ainsi que la superposition des deux fluorescences sont également montrées.

---

Figure 14 (page 56) : Localisation cellulaire de Mlfl-V5-His dans les cellules R1-ES. Transfection transitoire (FuGene6, Roche) avec le vecteur pcDNA3.1B/Mlfl-V5-His de cellules R1-ES, cultivées directement sur lame. Nous observons une localisation cytoplasmique de Mlfl suite au marquage des cellules avec l'anticorps contre V5 (souris anti-V5) et de l'anticorps secondaire conjugué au FITC (chèvre anti-souris IgG-FITC) (vert). Les noyaux ont été colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). La superposition des deux fluorescences est également montrée. La rangée du haut correspond au contrôle de cellules R1-ES non transfectées.

---

Figure 15 (page 57) : Localisation cellulaire de EGFP et Mlfl-GFP dans les cellules COS-7. Transfection transitoire par électroporation de cellules COS-7 avec les vecteurs pEGFP-N1 (A) et pEGFPN1/Mlfl-GFP (B). Les lames ont été observées directement suite à une coloration des noyaux au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). Nous observons une localisation cytoplasmique et nucléaire pour EGFP (vert) (A) et une localisation cytoplasmique pour Mlfl-GFP (vert) (B) dans les cellules COS-7. La superposition des deux fluorescences est également montrée.

---

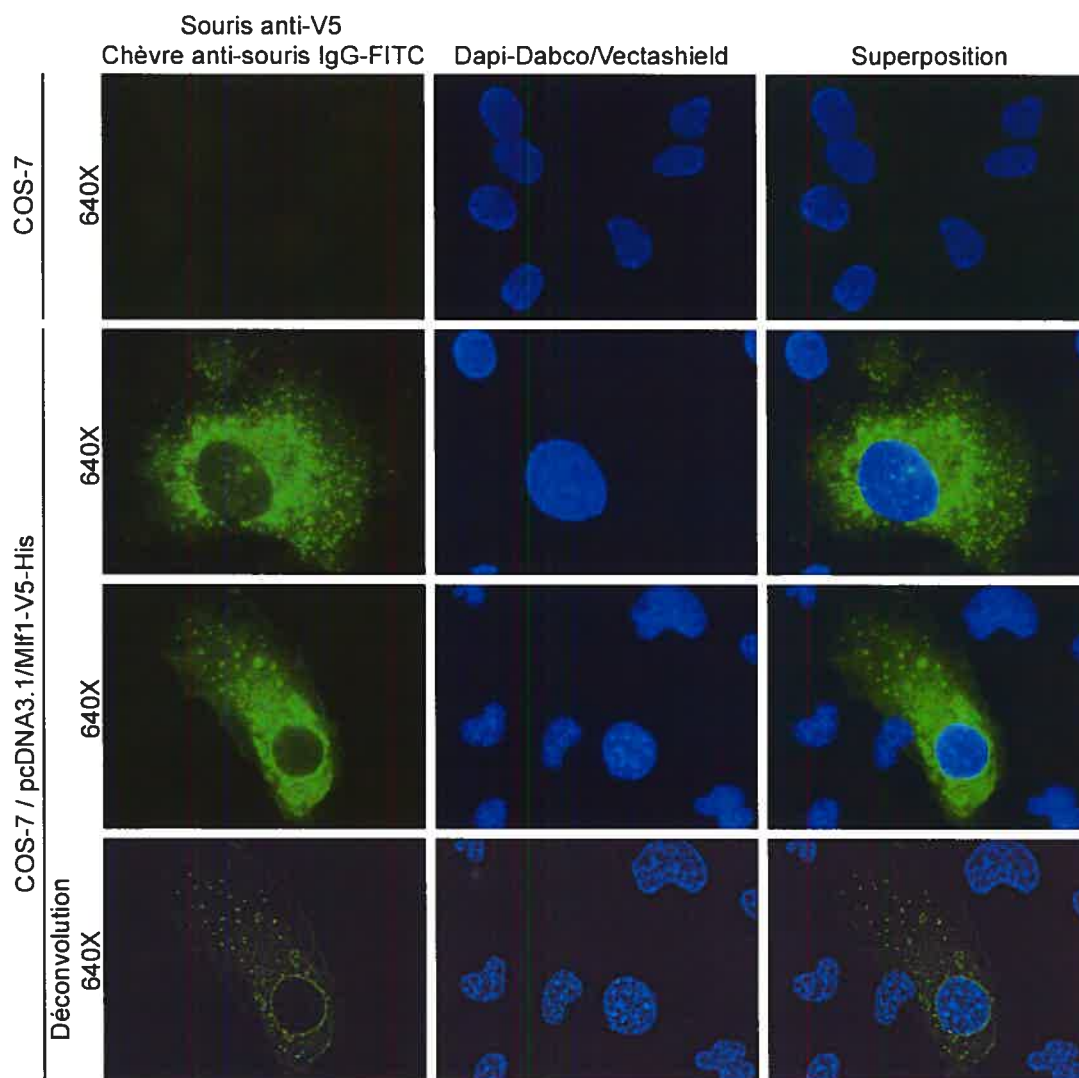


Figure 16 : Localisation cellulaire de Mlf1-V5-His dans les cellules COS-7. Transfection transitoire par électroporation avec le vecteur pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His de cellules COS-7 cultivées directement sur lame. Nous observons une localisation cytoplasmique de Mlf1 suite au marquage des cellules avec l'anticorps contre V5 (souris anti-V5) et de l'anticorps secondaire conjugué au FITC (chèvre anti-souris IgG-FITC) (vert). Les noyaux ont été colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). La déconvolution et la superposition des deux fluorescences sont également montrées. La rangée du haut correspond au contrôle de cellules COS-7 non transfectées.

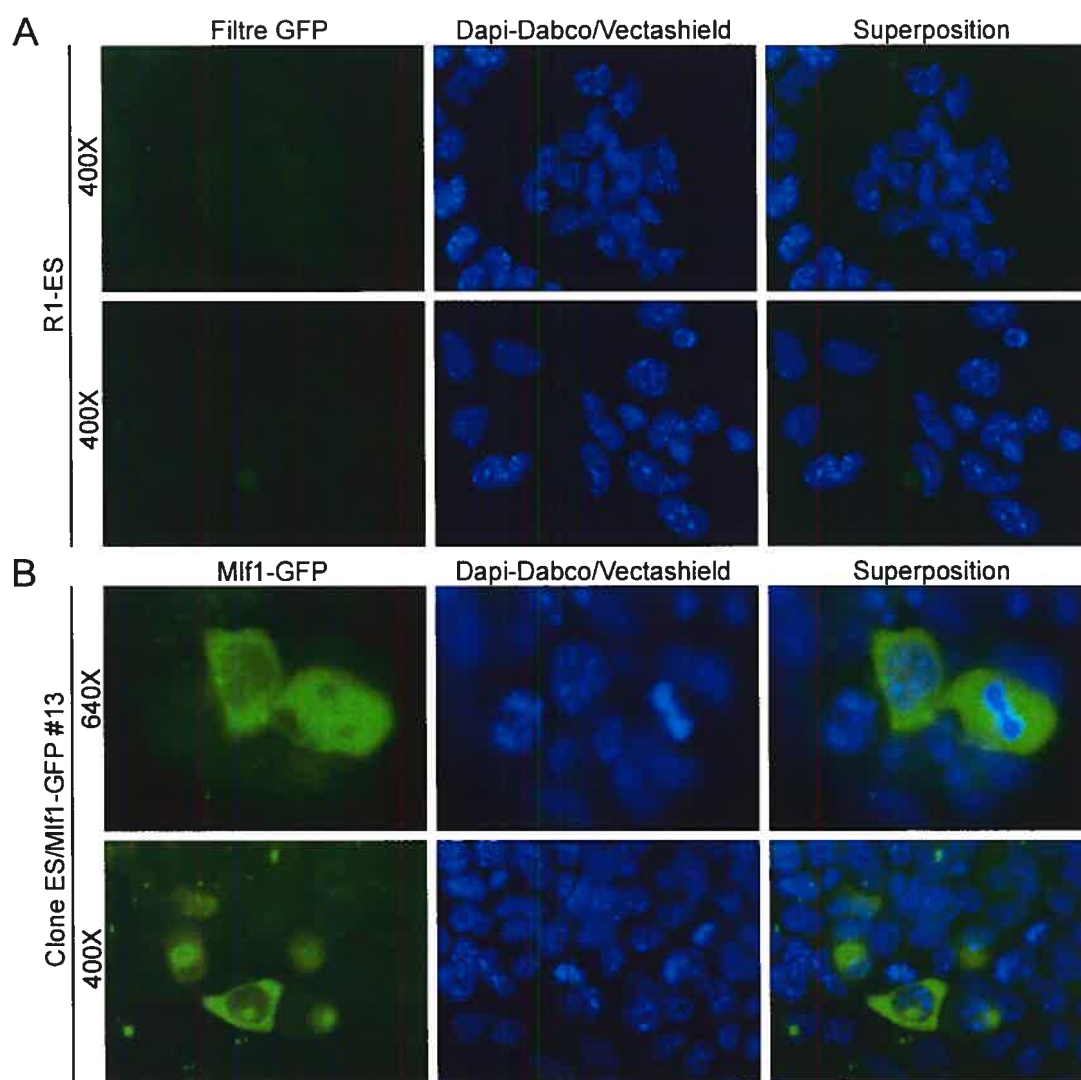


Figure 17 : Localisation cellulaire de Mlf1-GFP dans le clone ES/Mlf1-GFP #13. A) Cellules R1-ES non transfectées. B) La localisation cytoplasmique de Mlf1-GFP (vert) dans le clone ES/Mlf1-GFP #13 n'est pas observée pour toutes les cellules. Les cellules ont été cultivées sur lame puis, les lames ont été observées directement suite à une coloration des noyaux au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). La superposition des deux fluorescences est également montrée.

Dans certaines figures, il est possible d'envisager qu'il y ait localisation nucléaire de Mlfl (figure 12, 1<sup>ère</sup> rangée; figure 14, 3<sup>e</sup> rangée et figure 16, 2<sup>e</sup> rangée). Toutefois, ces points sont, en fait, des foci cytoplasmiques se trouvant à un autre point focal. Les déconvolutions des figures 12, 14 et 16 montrent bien qu'il n'y a pas de localisation nucléaire.

Nous avons également vérifié la localisation cellulaire de Mlfl-GFP dans les clones ES/Mlfl-GFP. La localisation obtenue est présentée à la figure 17B pour le clone ES/Mlfl-GFP #13, à titre d'exemple. Nous avons observé une localisation cytoplasmique avec une accumulation péri-nucléaire (foci). Aux panneaux de la dernière rangée de la figure 17B, nous observons un point semblant être dans le noyau, mais il est en fait dans le cytoplasme sous le noyau; encore là par déconvolution il semble que le centre de ce point soit plutôt en périphérie du noyau (données non montrées). Tel qu'attendu, tout comme dans nos résultats de cytométrie en flux (figure 2), nous avons observé que l'intensité de fluorescence ainsi que le pourcentage de cellules positives était faible dans le clone ES/Mlfl-GFP #13 comparativement aux transfections transitoires.

En résumé, ces résultats suggèrent que Mlfl se localise au niveau du cytoplasme sous forme de foci. Par contre, la localisation nucléaire n'a pu être démontrée. Ces résultats montrent également que le type cellulaire (R1-ES ou COS-7) ainsi que l'étiquette que porte la protéine (V5 ou la protéine EGFP), ne semblent pas influencer la localisation de Mlfl.

### **3.2.4 Traitement des clones ES/Mlfl-GFP avec un inhibiteur du protéasome**

La localisation cellulaire de Mlfl sous forme de foci semble correspondre à une localisation caractéristique du protéasome (Holmberg *et al.*, 2004). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé en cytométrie en flux des clones ES/EGFP et ES/Mlfl-GFP suite au traitement avec la clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone (Calbiochem), un inhibiteur du protéasome. Le protéasome est un complexe multi-enzymatique qui est inhibé par la clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone au niveau de sa composante 20S, laquelle contient plusieurs activités peptidases (Calbiochem, fiche technique de la clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone). Le protéasome joue un rôle important dans différents

mécanismes cellulaires. Il est notamment impliqué dans la régulation du cycle cellulaire au niveau des différents points de contrôle, entre autre au point de contrôle G2-M, en intervenant sur les niveaux des complexes CDK/cycline (Dou *et al.*, 2003). La figure 18 montre les résultats obtenus après l'analyse en cytométrie en flux des cellules R1-ES, des clones ES/EGFP #3 et #4 et des clones ES/Mif1-GFP #3 et #13 mis en présence (bandes grises) ou en absence (bande noires) de l'inhibiteur du protéasome. Nous avons observé, tel qu'attendu, aucune cellule GFP positive pour les cellules R1-ES. Nous avons également observé que les clones ES/Mif1-GFP #3 et #13 avaient respectivement une augmentation de 2,6 fois et 3,8 fois de leur nombre de cellules GFP positives par rapport à des niveaux plutôt constant pour les contrôles ES/EGFP #3 et #4. Ces résultats nous portent à croire que Mif1 semble être accumulé au protéasome et y être dégradé.

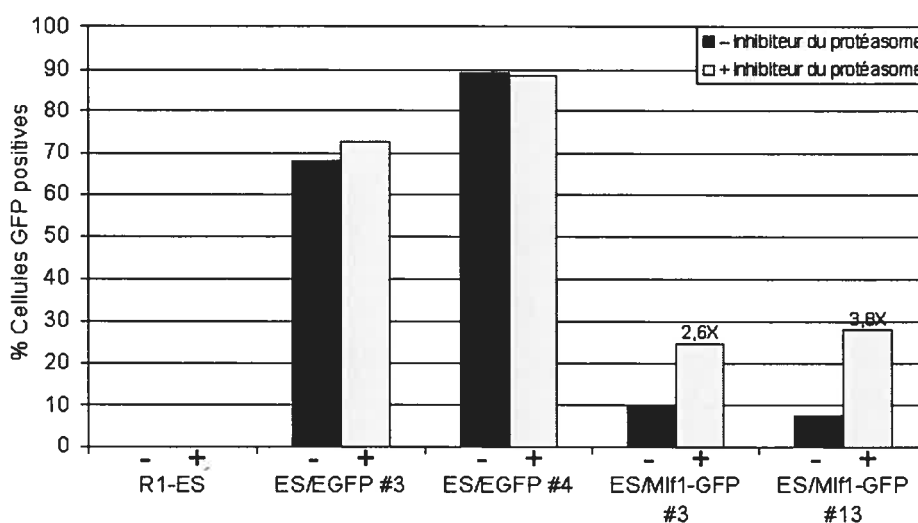


Figure 18 : Traitement avec la clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone des clones ES/EGFP et ES/Mif1-GFP. Le graphique représente le nombre de cellules GFP positives obtenue par analyse en cytométrie en flux des cellules non traitées et des cellules traitées avec l'inhibiteur du protéasome (clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone) pendant 15 heures.

## **4. Discussion**

Les oncoprotéines MLF1 et NPM-MLF1 sont impliquées dans certain cas de MDS et d'AML. Bien que certaines avancées aient été faites au niveau de la compréhension des modes de fonctionnement de Mlf1/MLF1, il demeure important d'en savoir plus sur les mécanismes d'action de ces oncoprotéines.

#### 4.1 L'établissement d'un modèle cellulaire

Afin de mieux caractériser Mlf1, il nous semblait important d'obtenir un modèle cellulaire comportant certaines caractéristiques, dont la flexibilité du type cellulaire et la facilité de détection de la protéine surexprimée. Un modèle cellulaire flexible permet d'analyser différents aspects tels que la prolifération, la différenciation et les voies de signalisation intracellulaire. Cependant, les travaux présentés dans ce mémoire démontrent bien que l'obtention d'un système cellulaire surexprimant Mlf1 n'est pas facile.

En effet, notre tentative d'établir notre modèle dans des cellules COS-7 n'a pas été fructueuse. Nous avons choisi ce type cellulaire parce que Williams *et al.* (1999) ont démontré dans ces cellules une localisation cytoplasmique et nucléaire de Mlf1. De plus, l'utilisation de cellules immortalisées nous semblait être un avantage pour la caractérisation de Mlf1. Nous avons donc obtenu par transfection plusieurs clones COS-7/Mlf1-V5-His. Par contre, parmi tous les clones isolés, seulement deux se sont avérés positifs pour le transgène Mlf1-V5-His et aucune expression de la protéine transgénique n'a pu être détectée. Il est possible qu'une sélection négative s'effectue avant même le repiquage des clones, c'est-à-dire que les cellules qui expriment fortement Mlf1 meurent par apoptose pendant les premiers jours de sélection au G418.

L'obtention du modèle cellulaire a également été tentée dans les cellules R1-ES en utilisant différentes constructions contenant Mlf1. Les cellules R1-ES sont un bon exemple d'un modèle cellulaire flexible. Lors de la transfection des cellules R1-ES avec le vecteur pEGFPN1/Mlf1, nos résultats ont montré qu'environ 20% des clones ES/Mlf1 sont morts par apoptose. La mort cellulaire des clones est survenue dans un intervalle de 10 à 22 jours suivant l'électroporation. De plus, la mort des clones

ES/Mlf1 était assez subite, c'est-à-dire que d'un jour à l'autre les cellules ES, qui sont normalement adhérentes, se retrouvaient en suspension dans le milieu de culture. La mort par apoptose, plutôt que par nécrose, a été confirmée par une coloration Wight-Geimsa. Pour ce qui est des clones que nous avons réussi à isoler, nous avons observé qu'ils ne surexprimaient pas Mlf1 de façon significative (figure 6).

Par la suite, la cosurexpression de Mlf1 et de Bcl-X<sub>L</sub> dans les cellules R1-ES n'a pas permis d'obtenir un modèle cellulaire fonctionnel. Le cycle cellulaire et le niveau d'apoptose des clones ES/Mlf1-V5-His/Bcl-X<sub>L</sub> et ES/Mlf1-V5-His ont été analysés. Les analyses n'ont montré aucune différence entre les deux types de clones et les cellules contrôles R1-ES. Toutefois, comme le niveau d'expression de la protéine transgénique n'a pas été déterminé, il est difficile d'interpréter ces résultats correctement. Ceci dit, ici encore une sélection négative des clones semble s'être opérée, ce qui porte à croire que nous avons isolé seulement des clones ayant une très faible expression de la protéine transgénique.

Il est donc possible qu'une expression élevée de Mlf1 dans les cellules R1-ES provoque leur apoptose. De fait, des observations bien établies sur les MDS montrent une augmentation de l'apoptose dans les cellules progénitrices hématopoïétiques lors des premiers stades du développement d'un MDS (Greenberg, 1998). Il est donc possible de faire un parallèle entre les cas de MDS associés avec une régulation anormale de MLF1 et l'apoptose dans les progéniteurs hématopoïétiques. De plus, Yoneda-Kato *et al.* (1999) ont observé que NPM-MLF1 est capable d'induire l'apoptose de certains types cellulaires et que le domaine important pour l'induction de cette apoptose se trouve sur la partie MLF1 de la protéine de fusion. Toutefois, il n'a pas été démontré clairement si c'est le domaine en N-terminal de MLF1 qui induit l'apoptose ou si l'apoptose n'est pas plutôt reliée à la fonction du site de liaison aux protéines 14-3-3. Nous soulevons ce point, puisque nous avons observé que le motif de liaison aux protéines 14-3-3 se trouve, en fait, coupé en deux *i.e.* détruit, dans le mutant de délétion de NPM-MLF1 qui a permis à Yoneda-Kato *et al.* (1999) d'affirmer que le domaine en N-terminal de MLF1 est important pour l'induction de l'apoptose.



La difficulté d'obtenir une expression stable de MLF1 dans différents types cellulaires a également été rapportée par Yoneda-Kato *et al.* (2005). Ils ont obtenu, lors de la transfection de MLF1 dans des NIH 3T3, un nombre inférieur de clones par rapport à leurs contrôles (GFP et NPM-MLF1). Ils ont déterminé qu'une expression stable de MLF1 dépendait du statut de p53 dans les cellules transfectées. Ils affirment que l'établissement de clones exprimant MLF1 a échoué dans les types cellulaires exprimant p53 de façon endogène, tels que les U2OS et les cellules myéloïdes immatures 32D. Toutefois, une expression stable de MLF1 a été observée dans les cellules M1 (p53 « null »), les K562 (mutation de p53) et dans les 293T (p53 inactivée) (Yoneda-Kato *et al.*, 2005). Les NIH 3T3 quant à elles, contiennent l'allèle de p53, mais elles ont le locus de ARF délété (Yoneda-Kato *et al.*, 2005). En ce qui nous concerne, la difficulté d'obtenir un modèle cellulaire fonctionnel doit être étroitement reliée à cette observation, puisque nous avons utilisé deux types cellulaires, les COS-7 et les R1-ES, qui expriment p53 de façon endogène. Donc l'expression de Mlfl dans ces cellules R1-ES peut provoquer une augmentation de p53, un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Bien que les cellules COS-7 (Gluzman, 1981) soient une lignée cellulaire transformées par « SV40 large T-antigen » (SV40LT) ce qui a pour effet de séquestrer p53 (Pipas et Levine, 2001), il est possible que la surexpression de Mlfl provoque un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose via un excès de p53 ne pouvant être contrôlé par SV40LT ou via un tout autre mécanisme qui demeurent à être identifiés.

Malgré le fait que les cellules R1-ES expriment p53 de façon endogène, la transfection stable de cellules R1-ES avec le vecteur pEGFPN1/Mlfl-GFP s'est enfin avérée positive, c'est-à-dire que nous avons obtenu un modèle cellulaire fonctionnel et facilement caractérisable. Nous avons obtenu plusieurs clones ES/Mlfl-GFP qui démontrent une variabilité dans le pourcentage de cellules GFP positives qu'ils contiennent (figure 9). La différence d'expression entre les différents clones ES/Mlfl-GFP pourrait s'expliquer par le site d'intégration des transgènes dans le génome des cellules et l'effet que peut avoir les régions d'hétérochromatine environnantes (Milot *et al.*, 1996). De plus, les clones ES/Mlfl-GFP expriment le

trangène faiblement (de 0,04% à 12,8%), comparativement aux clones contrôles ES/EGFP (60,7% et 88,2%). Le fait que les clones expriment un bas niveau de Mlfl-GFP pourrait expliquer que nous sommes capable de les maintenir en culture. Les cellules R1-ES, qui expriment Mlfl de façon endogène, ont sûrement la capacité de supporter une certaine augmentation de la quantité de Mlfl intracellulaire. Toutefois, si l'expression de Mlfl atteint un certain niveau, il y aurait activation de p53 et induction de l'apoptose. Afin d'améliorer notre modèle cellulaire, il serait intéressant d'effectuer une inactivation (« knock out ») ou encore une atténuation (« knock down ») de p53 dans nos clones ES/Mlfl-GFP. L'atténuation de p53, à l'aide du système de lentivirus exprimant un ARN interférence (Tiscornia *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2004), pourrait conduire à l'obtention d'un modèle dans lequel il y aurait un haut niveau d'expression de Mlfl.

En plus de la faible expression de la protéine de fusion, l'intensité de fluorescence des cellules GFP positives est également faible (figure 9B). Il a été démontré que la formation du chromophore de la GFP était le résultat de la cyclisation de ses acides aminés 65 à 67 (Yang *et al.*, 1996). Sans une structure correctement repliée, la GFP ne peut former le chromophore essentiel à sa fluorescence (Reid et Flynn, 1997). Il est donc possible que la structure tertiaire de la protéine de fusion Mlfl-GFP nuise à la formation du chromophore, causant ainsi une diminution de la fluorescence. Toutefois, il est plus probable que la faible intensité de fluorescence observée dans les clones ES/Mlfl-GFP soit due à une dégradation rapide, via le protéasome, de la protéine de fusion. Ce qui résulterait en une faible quantité intracellulaire de protéine Mlfl-GFP tel que démontré par le transfert de type western (figure 8B).

#### **4.2 Mlfl localise dans le cytoplasme des cellules ES et COS-7**

Les résultats des transfections transitoires démontrent que Mlfl localise dans le cytoplasme des cellules R1-ES et des cellules COS-7, et ce, indifféremment de l'étiquette fusionnée à Mlfl. De plus, la position de l'étiquette ne semble pas influencer sur la localisation de Mlfl, puisque la position de la protéine EGFP en 3' de Mlfl (notre étude) par rapport à la position en 5' (Yoneda-Kato *et al.*, 2005)

semble donner la même localisation cellulaire. La localisation cytoplasmique avec une certaine accumulation péri-nucléaire a également été rapportée par d'autre groupe (Lim *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1999; Yoneda-Kato *et al.*, 2005). La localisation péri-nucléaire correspond également à celle des protéines Madm et CSN3 avec lesquelles Mlf1/MLF1 colocalisent (Lim *et al.*, 2002; Yoneda-Kato *et al.*, 2005). Cependant toutes ces études de localisation, incluant la notre, ont été faites à l'aide d'une surexpression de Mlf1/MLF1. Nous ne pouvons pas exclure qu'à un niveau d'expression normale, le patron de localisation de Mlf1 soit exactement le même.

#### **4.2.1 Localisation de Mlf1 suite aux mutagenèses sur pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His**

Au cours de notre étude, nous avons déterminé que l'ADNc de Mlf1, que nous avons obtenu à partir de l'ARN de cœur de souris, contenait un exon supplémentaire de 45 paires de base (Ex3<sup>+</sup>) par rapport à la séquence de Mlf1 rapportée couramment dans la littérature. Nous avons donc effectué une mutagenèse dirigée sur le vecteur pcDNA3.1B/Mlf1-V5-His afin d'enlever l'Ex3<sup>+</sup>. Par cette mutagenèse, nous voulions savoir si l'Ex3<sup>+</sup> pouvait influencer sur la localisation cellulaire de Mlf1. Les résultats ne montrent pas de différence entre la localisation cellulaire de Mlf1-V5-His et Mlf1 $\Delta$ Ex3<sup>+</sup>-V5-His (figure 7).

Comme la protéine de fusion NPM-MLF1, causé par la translocation t(3;5), localise au noyau et qu'elle est associée à l'avènement de MDS, nous avons donc voulu insérer un NLS à la séquence de Mlf1 afin de la retrouver au noyau. Une fois la localisation nucléaire de Mlf1 obtenue, nous aurions été en mesure d'étudier différents mécanismes impliqués dans l'induction des MDS, par exemple la régulation du cycle cellulaire et de la différenciation. L'utilisation du NLS de NPM ne nous a toutefois pas permis d'obtenir la localisation nucléaire de NLS-Mlf1-V5-His (figure 7). Il est donc très probable que le NLS utilisé ne soit pas fonctionnel et différentes hypothèses sont envisageables. Premièrement, il est possible qu'une fois la protéine NLS-Mlf1-V5-His repliée, le NLS ne soit pas accessible au complexe protéique et aux pores nucléaires conduisant à une translocation nucléaire

(Gasiorowski et Dean, 2003). Une seconde possibilité, est que l'environnement en acides aminés autour du NLS n'est pas le même dans Mlfl que pour NPM. Les régions acides et site potentiel de liaison d'un métal dans NPM (figure 2) sont peut-être nécessaires pour que le NLS soit fonctionnel, tout comme l'est la phosphorylation du CKII situé au bord du NLS de SV40LT (Jans et Jans, 1994). L'utilisation d'un NLS utilisé de façon très répandue dans la littérature, tel que celui de SV40LT (Kalderon *et al.*, 1984; Yoneda, 1997), pourrait nous aider à contourner le problème de la localisation nucléaire.

#### **4.3 Expression en G2-M et dégradation aux protéasomes de Mlfl**

Nous avons ensuite poursuivi la caractérisation de Mlfl en effectuant un tri cellulaire des cellules GFP positives et négatives, sur le clone ES/Mlfl-GFP #3, suivi d'une analyse du cycle cellulaire. Les résultats du cycle cellulaire montrent que l'accumulation de Mlfl-GFP se produit de façon cycle cellulaire dépendante en phase G2-M (figure 11). Afin de vérifier le comportement de l'expression de Mlfl-GFP, les cellules triées sont remises en culture et elles sont suivies durant une certaine période de temps. Nous avons observé qu'après un enrichissement du nombre de cellules GFP positives dans le clone ES/Mlfl-GFP #3 (57% et 44%), le pourcentage de cellules GFP positives revenait environ au pourcentage observé avant le tri cellulaire (10%) (figure 10). En sélectionnant pour les cellules GFP positives, nous obtenons une population enrichie de cellules en phase G2-M. Par conséquent, lorsque nous remettons les cellules en culture, elles recommencent à proliférer et nous nous retrouvons avec des cellules dans toutes les phases du cycle (G1, S, G2 et M). La population de cellules en G2-M constitue alors qu'une partie de la population totale, ce qui explique la chute du pourcentage de cellules GFP positives. Pour ce qui est des cellules GFP négatives, le phénomène inverse a dû se produire. Suite au tri, nous avons obtenu des cellules en phase G1 et S pour lesquelles aucune expression de Mlfl-GFP n'était détectable. Lorsque les cellules se remettent en cycle, elles passent par la phase G2-M où nous détectons la protéine Mlfl-GFP.

Afin de confirmer l'accumulation de Mlfl-GFP en G2-M, nous avons tenté deux approches. Premièrement, en bloquant les cellules en G2 avec la colcémide, agent

qui inhibe la polymérisation des microtubules, nous avons voulu voir s'il y aurait une augmentation du nombre de cellules GFP positives à l'intérieur des clones. Deuxièmement, nous avons tenté, à l'aide d'une coloration au Hoechst, de vérifier le pourcentage de cellules GFP positives dans chaque phase du cycle. Toutefois, les conditions expérimentales n'ont pu être optimisées nous empêchant de déterminer de façon plus précise si Mlfl a bel et bien une expression G2-spécifique. Ces expériences seront donc répétées et optimisées éventuellement dans le laboratoire.

Une expression de Mlfl en phase G2-M suggère un rôle spécifique de Mlfl au cours du cycle cellulaire. Il a été démontré que Mlfl interagit directement avec la protéine MLF1IP (Hanissian *et al.*, 2004). MLF1IP possède une certaine homologie avec des protéines de la famille des SMC (« structural maintenance of chromosomes ») et avec la myosine (Hanissian *et al.*, 2004). Les SMC et les myosines sont des moteurs moléculaires couplés à une activité ATPase, qui sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires, par exemple le mouvement, la maintenance de l'intégrité chromosomique, la division cellulaire et l'organisation du cytosquelette (Hirano, 2005; Speck *et al.*, 2003; Yokomori, 2003). Hanissian *et al.* (2004) suggèrent une interaction entre le complexe MLF1IP/Mlfl et des protéines du kinétochore. Ce complexe pourrait donc jouer un rôle au niveau de la division cellulaire, supportant l'expression de MLF1 observée en G2-M.

Le traitement des clones ES/Mlfl-GFP avec la clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone, un inhibiteur du protéasome, démontre une relation entre Mlfl et le protéasome. En inhibant le protéasome nous observons 2,6 et 3,8 fois plus de cellules Mlfl-GFP positives (figure 18), indiquant que Mlfl serait dégradée au protéasome. Il est possible que le mauvais repliement de la protéine de fusion, à cause des étiquettes V5 dans un cas et EGFP dans l'autre, amène une localisation au protéasome. Mais, comme nous avons montré (section 3.2.3) qu'en utilisant deux étiquettes différentes que Mlfl localise au même endroit dans la cellule, il serait surprenant que s'en soit la cause. Nous croyons plutôt que Mlfl possède un taux de renouvellement rapide. Suivant l'expression de Mlfl de façon spécifique en phase G2-M, Mlfl effectuerait

son rôle au niveau cellulaire, puis la protéine devrait être rapidement dégradée afin qu'elle ne soit pas présente dans les autres phases du cycle; dégradation qui se produirait au protéasome (voir modèle figure 19). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que Mlf1 soit transcrit plus tôt dans le cycle, comme en phase S, et que la traduction de son ARN messager s'effectuerait seulement en phase G2. Une autre possibilité serait que la traduction de la protéine débiterait en phase S pour ce poursuivre en phase G2, mais que l'accumulation de la protéine ne serait détectable qu'en G2. Nous pouvons également penser que la surexpression de Mlf1 puisse conduire à une localisation et une dégradation au protéasome, ce qui indiquerait qu'il existe un mécanisme de régulation de l'accumulation de Mlf1 dans la cellule.

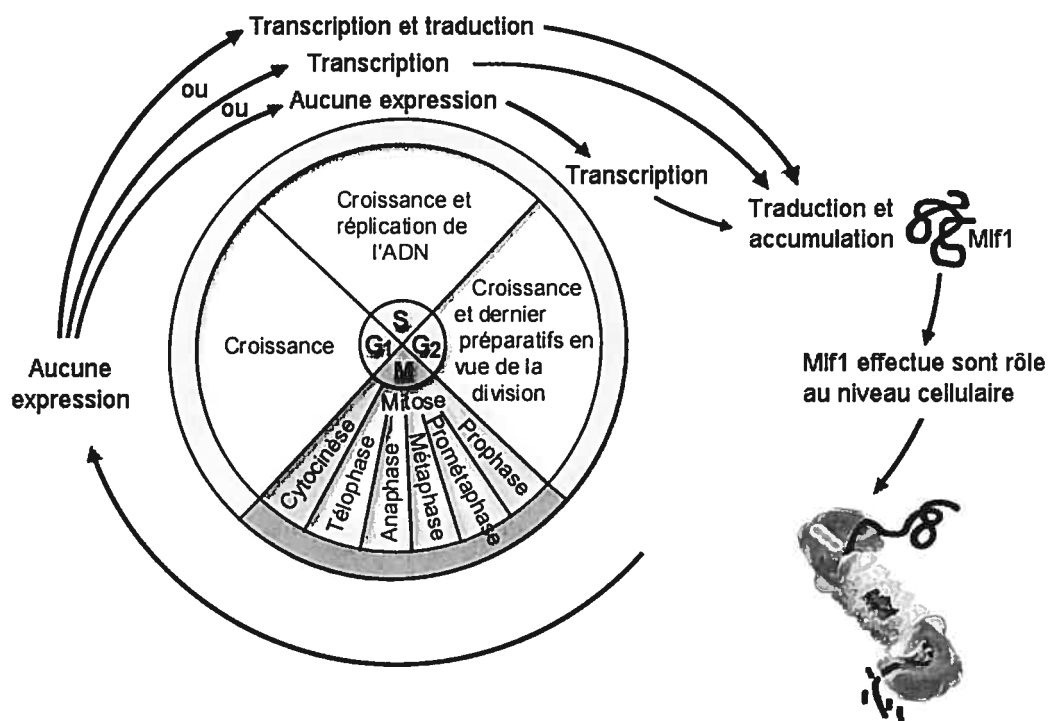


Figure 19 : Modèle reliant une expression cycle cellulaire spécifique de Mlf1 avec sa dégradation au protéasome.

Le ciblage des protéines au protéasome implique l'ubiquitination de celles-ci sur des résidus lysines (Hershko et Ciechanover, 1998). La dégradation de protéines via le système de l'ubiquitination-protéasome joue un rôle important dans plusieurs processus cellulaires, tels que la progression du cycle cellulaire, la régulation de la

transcription et l'apoptose, pour ne nommer que ceux-là (Hershko et Ciechanover, 1998). Toutefois, la dégradation au protéasome peut également s'effectuer de façon ubiquitine indépendante (Orlowski et Wilk, 2003). Éventuellement, il serait intéressant de vérifier, à l'aide d'un anticorps spécifique, si Mlf1 est ubiquitinée en vu de son ciblage au protéasome. Il serait également intéressant de déterminer la demi-vie de Mlf1 en effectuant une immunoprécipitation de protéines marquées avec un isotope (« pulse-chase ») (Corish et Tyler-Smith, 1999).

#### 4.4 Mlf1/MLF1 et les différents modèles cellulaires

Tentons maintenant d'intégrer les différents mécanismes d'action proposés pour Mlf1/MLF1. D'abord, analysons le modèle des cellules érythroleucémiques J2E exprimant Mlf1. Les cellules J2E entrent en différenciation lorsqu'elles sont mises en présence d'EPO. Par contre, l'expression ectopique de Mlf1 dans ces cellules provoque une inhibition de la différenciation induite par l'EPO. La protéine Mlf1 inhibe l'accumulation de p27<sup>Kip1</sup> dans la cellule ce qui fait qu'il n'y a pas d'arrêt du cycle cellulaire, arrêt nécessaire à la différenciation. Les cellules continuent donc à proliférer même lorsque stimulées par l'EPO (Winteringham *et al.*, 2004). L'effet de Mlf1 sur les cellules J2E, c'est-à-dire la prolifération, est cohérent avec les observations faites dans les cas de MDS et AML. Ensuite, dans des fibroblastes immortalisés NIH 3T3, il a été proposé que MLF1 provoque un arrêt du cycle cellulaire et une accumulation des cellules en phase G1, via une accumulation de p53 (Yoneda-Kato *et al.*, 2005). Enfin, dans les cellules R1-ES, nous avons observé une expression importante de Mlf1 en phase G2-M.

Il semble donc que l'influence de Mlf1/MLF1 diffère selon le contexte. Il peut donc influencer le cycle cellulaire par deux effecteurs soit p27<sup>Kip1</sup> et p53. L'influence de Mlf1/MLF1 sur le cycle cellulaire est opposée selon la voie de régulation enclenchée. De plus, dans les cellules R1-ES, l'expression de Mlf1 en G2-M semble indiquer qu'il jouerait un rôle au niveau de la division cellulaire. Notre modèle cellulaire de cellules R1-ES fait appel à des cellules multipotentes non transformées, comparativement aux deux autres modèles qui utilisent des cellules transformées ou immortalisées, ce qui nous semble être un avantage. Comme les cellules R1-ES ne

sont pas immortalisées, nous croyons que l'utilisation de ces cellules constitue un modèle qui reproduit plus fidèlement l'effet de Mlf1 dans les cellules progénitrices. Il sera donc intéressant de vérifier l'effet de Mlf1 lors de la différenciation de cellules ES/Mlf1-GFP vers la lignée érythroïde et myéloïde.

#### **4.5 Conclusion**

En conclusion, nos résultats démontrent que la protéine Mlf1 localise dans le cytoplasme. De plus, nous observons une expression élevée de Mlf1 en phase G2-M du cycle cellulaire et la dégradation de Mlf1 semble s'effectuer au protéasome. L'avancement de la connaissance sur Mlf1/MLF1 pourrait conduire au développement de thérapie afin de traiter les patients atteints de MDS et d'AML associés à une dérégulation de MLF1.



## **5. Références**

- Aitken A. (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol*, **6**, 341-347.
- Aitken A., Collinge D.B., van Heusden B.P., Isobe T., Roseboom P.H., Rosenfeld G. et Soll J. (1992) 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci*, **17**, 498-501.
- Aitken A., Howell S., Jones D., Madrazo J., Martin H., Patel Y. et Robinson K. (1995) Post-translationally modified 14-3-3 isoforms and inhibition of protein kinase C. *Mol Cell Biochem*, **149-150**, 41-49.
- American Cancer Society, Statistiques 2004, <http://www.cancer.org/>
- Armstrong J.A., Bieker J.J. et Emerson B.M. (1998) A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell*, **95**, 93-104.
- Barreda D.R., Hanington P.C. et Belosevic M. (2004) Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol*, **28**, 509-554.
- Ben-Neriah Y., Daley G.Q., Mes-Masson A.M., Witte O.N. et Baltimore D. (1986) The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*, **233**, 212-214.
- Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R. et Sultan C. (1982) Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, **51**, 189-199.
- Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R. et Sultan C. (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, **103**, 620-625.
- Bischof D., Pulford K., Mason D.Y. et Morris S.W. (1997) Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol*, **17**, 2312-2325.

- Bonnefoy-Berard N., Liu Y.C., von Willebrand M., Sung A., Elly C., Mustelin T., Yoshida H., Ishizaka K. et Altman A. (1995) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10142-10146.
- Borer R.A., Lehner C.F., Eppenberger H.M. et Nigg E.A. (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, **56**, 379-390.
- Boulton T.G., Stahl N. et Yancopoulos G.D. (1994) Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem*, **269**, 11648-11655.
- Boulton J., Lewis S. et Wainscoat J.S. (1994) The 5q-syndrome. *Blood*, **84**, 3253-3260.
- Braithwaite A.W., Royds J.A. et Jackson P. (2005) The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis*, **26**, 1161-1169.
- Busfield S.J. et Klinken S.P. (1992) Erythropoietin-induced stimulation of differentiation and proliferation in J2E cells is not mimicked by chemical induction. *Blood*, **80**, 412-419.
- Calabretta B. et Perrotti D. (2004) The biology of CML blast crisis. *Blood*, **103**, 4010-4022.
- Cartwright P., McLean C., Sheppard A., Rivett D., Jones K. et Dalton S. (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, **132**, 885-896.
- Cell Signaling Technology, <http://www.cellsignal.com/>
- Charpentier A. (1996) *Sang et cellules sanguines*. Nathan, Paris.
- Colombo E., Marine J.C., Danovi D., Falini B. et Pelicci P.G. (2002) Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*, **4**, 529-533.
- Corish P. et Tyler-Smith C. (1999) Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng*, **12**, 1035-1040.
- Darnell J.E., Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science*, **277**, 1630-1635.

- Deane N.G., Parker M.A. et Beauchamp R.D. (2005) Cell proliferation: a matter of time and place. *Surgery*, **138**, 1-7.
- Desagher S. et Martinou J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, **10**, 369-377.
- Deveraux Q.L. et Reed J.C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-252.
- Di Bacco A., Keeshan K., McKenna S.L. et Cotter T.G. (2000) Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist*, **5**, 405-415.
- Donze D., Townes T.M. et Bieker J.J. (1995) Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*, **270**, 1955-1959.
- Dornan D., Wertz I., Shimizu H., Arnott D., Frantz G.D., Dowd P., O'Rourke K., Koeppen H. et Dixit V.M. (2004) The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*, **429**, 86-92.
- Dou Q.P., Smith D.M., Daniel K.G. et Kazi A. (2003) Interruption of tumor cell cycle progression through proteasome inhibition: implications for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res*, **5**, 441-446.
- Dougherty M.K. et Morrison D.K. (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci*, **117**, 1875-1884.
- Dreyfus B., Breton-Gorius J., Reyes F., Rochant H., Rosa J. et Vernant J.-P. (1992) *L'hématologie de Bernard Dreyfus*. Flammarion médecine-sciences, Paris.
- Dzierzak E., Medvinsky A. et de Bruijn M. (1998) Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunol Today*, **19**, 228-236.
- Fantl W.J., Muslin A.J., Kikuchi A., Martin J.A., MacNicol A.M., Gross R.W. et Williams L.T. (1994) Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature*, **371**, 612-614.
- Filippi M.D. et Sainteny F. (2001) Hematopoietic differentiation of embryonic stem cells in mice: a model to study the biology of hematopoiesis. *Transfus Clin Biol*, **8**, 6-16.

- Friedman A.D. (2002) Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*, **21**, 3377-3390.
- Fujimoto J., Shiota M., Iwahara T., Seki N., Satoh H., Mori S. et Yamamoto T. (1996) Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4181-4186.
- Gasiorowski J.Z. et Dean D.A. (2003) Mechanisms of nuclear transport and interventions. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**, 703-716.
- Gluzman Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182.
- Goodwin A.J., McInerney J.M., Glander M.A., Pomerantz O. et Lowrey C.H. (2001) In vivo formation of a human beta-globin locus control region core element requires binding sites for multiple factors including GATA-1, NF-E2, erythroid Kruppel-like factor, and Sp1. *J Biol Chem*, **276**, 26883-26892.
- Greenberg P.L. (1998) Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leuk Res*, **22**, 1123-1136.
- Gross A., McDonnell J.M. et Korsmeyer S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-1911.
- Grozinger C.M. et Schreiber S.L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7835-7840.
- Hanissian S.H., Akbar U., Teng B., Janjetovic Z., Hoffmann A., Hitzler J.K., Iscove N., Hamre K., Du X., Tong Y., Mukatira S., Robertson J.H. et Morris S.W. (2004) cDNA cloning and characterization of a novel gene encoding the MLF1-interacting protein MLF1IP. *Oncogene*, **23**, 3700-3707.
- Henriksson M.L., Francis M.S., Peden A., Aili M., Stefansson K., Palmer R., Aitken A. et Hallberg B. (2002) A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional in vivo. *Eur J Biochem*, **269**, 4921-4929.
- Hershko A. et Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.

- Hirai H. (2002) Molecular pathogenesis of MDS. *Int J Hematol*, **76 Suppl 2**, 213-221.
- Hirano T. (2005) SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **360**, 507-514.
- Hitzler J.K., Witte D.P., Jenkins N.A., Copeland N.G., Gilbert D.J., Naeve C.W., Look A.T. et Morris S.W. (1999) cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization of Mlf1, murine homologue of a gene involved in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Am J Pathol*, **155**, 53-59.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. et Harris C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Holmberg C.I., Staniszewski K.E., Mensah K.N., Matouschek A. et Morimoto R.I. (2004) Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *Embo J*, **23**, 4307-4318.
- Hooper J.D., Baker E., Ogbourne S.M., Sutherland G.R. et Antalis T.M. (2000) Cloning of the cDNA and localization of the gene encoding human NRBP, a ubiquitously expressed, multidomain putative adapter protein. *Genomics*, **66**, 113-118.
- Hsieh F.F., Barnett L.A., Green W.F., Freedman K., Matushansky I., Skoultschi A.I. et Kelley L.L. (2000) Cell cycle exit during terminal erythroid differentiation is associated with accumulation of p27(Kip1) and inactivation of cdk2 kinase. *Blood*, **96**, 2746-2754.
- Inouye C.J. et Seto E. (1994) Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J Biol Chem*, **269**, 6506-6510.
- Jans D.A. et Jans P. (1994) Negative charge at the casein kinase II site flanking the nuclear localization signal of the SV40 large T-antigen is mechanistically important for enhanced nuclear import. *Oncogene*, **9**, 2961-2968.
- Jones D.H., Ley S. et Aitken A. (1995) Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett*, **368**, 55-58.

- Kalderon D., Richardson W.D., Markham A.F. et Smith A.E. (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, **311**, 33-38.
- Kawamoto H. et Minato N. (2004) Myeloid cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 1374-1379.
- Keil U., Busfield S.J., Farr T.J., Papadimitriou J., Green A.R., Begley C.G. et Klinken S.P. (1995) Emergence of myeloid cells from cultures of J2E erythroid cells is linked with karyotypic abnormalities. *Cell Growth Differ*, **6**, 439-448.
- Keller G., Kennedy M., Papayannopoulou T. et Wiles M.V. (1993) Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*, **13**, 473-486.
- Klinken S.P. (1999) Regulation of hemopoietic system. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 983-989.
- Klinken S.P., Nicola N.A. et Johnson G.R. (1988) In vitro-derived leukemic erythroid cell lines induced by a raf- and myc-containing retrovirus differentiate in response to erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8506-8510.
- Kozak M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, **15**, 8125-8148.
- Krammer P.H., Galle P.R., Moller P. et Debatin K.M. (1998) CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in normal and malignant liver, colon, and hematopoietic cells. *Adv Cancer Res*, **75**, 251-273.
- Krueger A., Baumann S., Krammer P.H. et Kirchhoff S. (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 8247-8254.
- Kuefer M.U., Look A.T., Williams D.C., Valentine V., Naeve C.W., Behm F.G., Mullersman J.E., Yoneda-Kato N., Montgomery K., Kucherlapati R. et Morris S.W. (1996) cDNA cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of myelodysplasia/myeloid leukemia factor 2 (MLF2). *Genomics*, **35**, 392-396.
- Lane D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.

- Lee Y.M. et Lee S.C. (1994) Transcriptional activation of the alpha-1 acid glycoprotein gene by YY1 is mediated by its functional interaction with a negative transcription factor. *DNA Cell Biol*, **13**, 1029-1036.
- Lim R., Winteringham L.N., Williams J.H., McCulloch R.K., Ingley E., Tiao J.Y., Lalonde J.P., Tsai S., Tilbrook P.A., Sun Y., Wu X., Morris S.W. et Klinken S.P. (2002) MADM, a novel adaptor protein that mediates phosphorylation of the 14-3-3 binding site of myeloid leukemia factor 1. *J Biol Chem*, **277**, 40997-41008.
- Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R.J., Fu H. et Liddington R. (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*, **376**, 191-194.
- Liu Q.R. et Chan P.K. (1991) Formation of nucleophosmin/B23 oligomers requires both the amino- and the carboxyl-terminal domains of the protein. *Eur J Biochem*, **200**, 715-721.
- Look A.T. (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, **278**, 1059-1064.
- Matsumoto N., Yoneda-Kato N., Iguchi T., Kishimoto Y., Kyo T., Sawada H., Tatsumi E. et Fukuhara S. (2000) Elevated MLF1 expression correlates with malignant progression from myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, **14**, 1757-1765.
- Mehta A.B. et Hoffbrand A.V. (2003) *Hématologie*. De Boeck, Paris.
- Mhawech P. (2005) 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res*, **15**, 228-236.
- Milot E., Strouboulis J., Trimborn T., Wijgerde M., de Boer E., Langeveld A., Tan-Un K., Vergeer W., Yannoutsos N., Grosveld F. et Fraser P. (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell*, **87**, 105-114.
- Mitelman F. (1993) The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, **11 Suppl 1**, 11-15.
- Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B., Dittmer K.G., Shapiro D.N., Saltman D.L. et Look A.T. (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, **263**, 1281-1284.



- Munker R., Hiller E. et Paquette R. (2000) *Modern hematology : biology and clinical management*. Humana Press, Totowa, N.J.
- Muslin A.J., Tanner J.W., Allen P.M. et Shaw A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**, 889-897.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W. et Roder J.C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8424-8428.
- Nomura M., Shimizu S., Sugiyama T., Narita M., Ito T., Matsuda H. et Tsujimoto Y. (2003) 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem*, **278**, 2058-2065.
- Okuda M. (2002) The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene*, **21**, 6170-6174.
- Olson M.O., Wallace M.O., Herrera A.H., Marshall-Carlson L. et Hunt R.C. (1986) Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry*, **25**, 484-491.
- Orkin S.H. (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*, **1**, 57-64.
- Orkin S.H. et Zon L.I. (2002) Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol*, **3**, 323-328.
- Orlowski M. et Wilk S. (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys*, **415**, 1-5.
- Oshimura M., Hayata I., Kakati S. et Sandberg A.A. (1976) Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XVII. Banding studies in acute myeloblastic leukemia (AML). *Cancer*, **38**, 748-761.
- Palmgren M., Fuglsang A. et Jahn T. (1998) Deciphering the role of 14-3-3 proteins. *Experimental Biology Online - EBO*, **3**.
- Pandolfi P.P. (1996) PML, PLZF and NPM genes in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*, **81**, 472-482.

- Paquette R.L., Landaw E.M., Pierre R.V., Kahan J., Lubbert M., Lazcano O., Isaac G., McCormick F. et Koeffler H.P. (1993) N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood*, **82**, 590-599.
- Peng C.Y., Graves P.R., Thoma R.S., Wu Z., Shaw A.S. et Piwnica-Worms H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, **277**, 1501-1505.
- Pipas J.M. et Levine A.J. (2001) Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*, **11**, 23-30.
- Pui C.H., Relling M.V. et Downing J.R. (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, **350**, 1535-1548.
- Raimondi S.C., Dube I.D., Valentine M.B., Mirro J., Jr., Watt H.J., Larson R.A., Bitter M.A., Le Beau M.M. et Rowley J.D. (1989) Clinicopathologic manifestations and breakpoints of the t(3;5) in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Leukemia*, **3**, 42-47.
- Rathmell J.C. et Thompson C.B. (1999) The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **17**, 781-828.
- Redner R.L., Rush E.A., Faas S., Rudert W.A. et Corey S.J. (1996) The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*, **87**, 882-886.
- Reid B.G. et Flynn G.C. (1997) Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*, **36**, 6786-6791.
- Reuther G.W., Fu H., Cripe L.D., Collier R.J. et Pendergast A.M. (1994) Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science*, **266**, 129-133.
- Rowley J.D. (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, **243**, 290-293.
- Rowley J.D. et Potter D. (1976) Chromosomal banding patterns in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*, **47**, 705-721.

- Sakahira H., Enari M. et Nagata S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **391**, 96-99.
- Schmitt E., Cimoli G., Steyaert A. et Bertrand R. (1998) Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Exp Cell Res*, **240**, 107-121.
- Schmitz I., Kirchhoff S. et Krammer P.H. (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 1123-1136.
- Sekimoto T., Fukumoto M. et Yoneda Y. (2004) 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *Embo J*, **23**, 1934-1942.
- Sherr C.J. et McCormick F. (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, **2**, 103-112.
- Sherr C.J. et Roberts J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Shi Y. (2004) Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell*, **117**, 855-858.
- Speck O., Hughes S.C., Noren N.K., Kulikaukas R.M. et Fehon R.G. (2003) Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature*, **421**, 83-87.
- Sprick M.R., Weigand M.A., Rieser E., Rauch C.T., Juo P., Blenis J., Krammer P.H. et Walczak H. (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, **12**, 599-609.
- Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., Wagner L., Shenmen C.M., Schuler G.D., Altschul S.F., Zeeberg B., et al. (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16899-16903.
- Subramanian R.R., Masters S.C., Zhang H. et Fu H. (2001) Functional conservation of 14-3-3 isoforms in inhibiting bad-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, **271**, 142-151.

- Szebeni A., Herrera J.E. et Olson M.O. (1995) Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry*, **34**, 8037-8042.
- Szebeni A., Hingorani K., Negi S. et Olson M.O. (2003) Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein b23. *J Biol Chem*, **278**, 9107-9115.
- Szebeni A. et Olson M.O. (1999) Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci*, **8**, 905-912.
- Tan Y., Demeter M.R., Ruan H. et Comb M.J. (2000) BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *J Biol Chem*, **275**, 25865-25869.
- Tilbrook P.A., Ingley E., Williams J.H., Hibbs M.L. et Klinken S.P. (1997) Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *Embo J*, **16**, 1610-1619.
- Tiscornia G., Tergaonkar V., Galimi F. et Verma I.M. (2004) CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7347-7351.
- Tokuyama Y., Horn H.F., Kawamura K., Tarapore P. et Fukasawa K. (2001) Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem*, **276**, 21529-21537.
- Van den Berghe H., Vermaelen K., Mecucci C., Barbieri D. et Tricot G. (1985) The 5q-anomaly. *Cancer Genet Cytogenet*, **17**, 189-255.
- Ventura A., Meissner A., Dillon C.P., McManus M., Sharp P.A., Van Parijs L., Jaenisch R. et Jacks T. (2004) Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10380-10385.
- Wang H. et Chong S. (2003) Visualization of coupled protein folding and binding in bacteria and purification of the heterodimeric complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 478-483.

- Waterman M.J., Stavridi E.S., Waterman J.L. et Halazonetis T.D. (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet*, **19**, 175-178.
- Wijgerde M. (1998) Chromatin dynamics and the regulation of  $\beta$ -globine gene expression. Erasmus University Rotterdam, Rotterdam, chapitre 1.
- Wijgerde M., Gribnau J., Trimborn T., Nuez B., Philipsen S., Grosveld F. et Fraser P. (1996) The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes Dev*, **10**, 2894-2902.
- Williams J.H., Daly L.N., Ingley E., Beaumont J.G., Tilbrook P.A., Lalonde J.P., Stillitano J.P. et Klinken S.P. (1999) HLS7, a hemopoietic lineage switch gene homologous to the leukemia-inducing gene MLF1. *Embo J*, **18**, 5559-5566.
- Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A. et Gough N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **336**, 684-687.
- Winteringham L.N., Kobelke S., Williams J.H., Ingley E. et Klinken S.P. (2004) Myeloid Leukemia Factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene*, **23**, 5105-5109.
- Xiao B., Smerdon S.J., Jones D.H., Dodson G.G., Soneji Y., Aitken A. et Gamblin S.J. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature*, **376**, 188-191.
- Xie J., Briggs J.A., Morris S.W., Olson M.O., Kinney M.C. et Briggs R.C. (1997) MNDA binds NPM/B23 and the NPM-MLF1 chimera generated by the t(3;5) associated with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, **25**, 1111-1117.
- Yaffe M.B., Rittinger K., Volinia S., Caron P.R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S.J., Smerdon S.J. et Cantley L.C. (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, **91**, 961-971.
- Yang F., Moss L.G. et Phillips G.N., Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, **14**, 1246-1251.

- Ying Q.L., Nichols J., Chambers I. et Smith A. (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, **115**, 281-292.
- Yokomori K. (2003) SMC protein complexes and the maintenance of chromosome integrity. *Curr Top Microbiol Immunol*, **274**, 79-112.
- Yoneda Y. (1997) How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *J Biochem (Tokyo)*, **121**, 811-817.
- Yoneda-Kato N., Fukuhara S. et Kato J. (1999) Apoptosis induced by the myelodysplastic syndrome-associated NPM-MLF1 chimeric protein. *Oncogene*, **18**, 3716-3724.
- Yoneda-Kato N., Look A.T., Kirstein M.N., Valentine M.B., Raimondi S.C., Cohen K.J., Carroll A.J. et Morris S.W. (1996) The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene*, **12**, 265-275.
- Yoneda-Kato N., Tomoda K., Umehara M., Arata Y. et Kato J.Y. (2005) Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *Embo J*, **24**, 1739-1749.
- Yung B.Y. et Chan P.K. (1987) Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. *Biochim Biophys Acta*, **925**, 74-82.
- Zamzami N. et Kroemer G. (2005) p53 in apoptosis control: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 685-687.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. et Korsmeyer S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, **87**, 619-628.

## **Annexe I**

Dans le cadre de l'étude de régulations génétiques, nous avons étudié dans ce présent ouvrage le gène *Mlf1* qui a une régulation anormale dans certaines pathologies de l'hématopoïèse. Toutefois, l'étude de la régulation anormale des gènes lors de l'hématopoïèse peut être effectuée de plusieurs autres façons et dans différents modèles. Au cours de ma maîtrise, j'ai eu la chance de participer au projet du Dre Stefania Bottardi qui porte sur l'étude des régulations épigénétiques anormales lors de l'hématopoïèse.

La régulation épigénétique se définit comme la variation de l'expression d'un gène par des modifications indépendantes de sa séquence nucléotidique. La modification de la structure de la chromatine par des modifications covalentes sur les extrémités N-terminales des histones est une des régulations épigénétiques importantes. Par exemple, l'acétylation des histones H3 et H4 ainsi que la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 sont habituellement associées à une chromatine transcriptionnellement active (euchromatine). Par contre, la méthylation sur les lysines 9 et 27 de l'histone H3 est généralement associée avec une chromatine condensée (hétérochromatine) où peu de transcription de gènes est effectuée.

Le locus de la  $\beta$ -globine est un modèle très bien caractérisé qui est grandement utilisé pour l'étude de la régulation épigénétique. Au laboratoire, nous possédons plusieurs lignées de souris transgéniques pour le locus de la  $\beta$ -globine humaine, dont la lignée  $\Delta 2B$  pour laquelle le site hypersensible HS2 est délété. Cette lignée montre un patron d'expression de la  $\beta$ -globine humaine soumis à l'effet de positionnement (PEV).

Cette étude avait pour but de déterminer si la régulation épigénétique anormale du gène de la  $\beta$ -globine était le résultat d'une organisation anormale de la chromatine dans des cellules progénitrices multipotentes de la moelle osseuse. Si tel était le cas, nous voulions savoir s'il est possible de prévenir la régulation anormale par un traitement des cellules progénitrices avant le début de l'expression des gènes de la globine.



J'ai participé plus particulièrement à cette étude en effectuant une PCR quantitative en temps réel sur des progéniteurs hématopoïétiques de la lignée  $\Delta 2B$  mis en culture en méthylcellulose et cultivés jusqu'au stade de BFU-E (« burst forming unit-erythroid »). Le but était de mesurer les variations dans le patron d'expression de la  $\beta$ -globine humaine de différentes colonies BFU-E  $\Delta 2B$  en comparant avec le patron d'expression des colonies BFU-E de la lignée In2, qui elle n'est pas soumise à un PEV. L'analyse de l'expression de la  $\beta$ -globine humaine a été faite par rapport à un contrôle interne, soit le gène *gapdh*. Nous avons observé que les différentes colonies BFU-E expriment la  $\beta$ -globine humaine à plusieurs niveaux, c'est-à-dire d'une forte expression à aucune expression. Ceci indique que les marques épigénétiques sont déterminées avant le début de la transcription des gènes et que ces marques sont perpétuées de façon clonale, mais qu'un certain pourcentage de réversion des marques est permis.

Ces résultats combinés aux autres du Dre Bottardi présentés dans l'article « Onset and inheritance of abnormal epigenetic regulation in hematopoietic cells » (Bottardi *et al.*, 2005) indiquent que la régulation épigénétique anormale d'un gène peut être détectée et modifiée avant la transcription de gène tissu-spécifique.

# Onset and inheritance of abnormal epigenetic regulation in hematopoietic cells

Stefania Bottardi, Vincent Bourgoïn, Natacha Pierre-Charles and Eric Milot\*

Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 Boulevard l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

Received October 6, 2004; Revised December 9, 2004; Accepted December 16, 2004

**Abnormal epigenetic regulation of gene expression contributes significantly to a variety of human pathologies including cancer. Deletion of hypersensitive site 2 (HS2) at the human  $\beta$ -globin locus control region can lead to abnormal epigenetic regulation of globin genes in transgenic mice. Here, two HS2-deleted transgenic mouse lines were used as model to demonstrate that heritable alteration of chromatin organization at the human  $\beta$ -globin locus in multipotent hematopoietic progenitors contributes to the abnormal expression of the  $\beta$ -globin gene in mature erythroid cells. This alteration is characterized by specific patterns of histone covalent modifications that are inherited during erythropoiesis and, moreover, is plastic because it can be reverted by transient treatment with the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A. Altogether, our results indicate that aberrant epigenetic regulation can be detected and modified before tissue-specific gene transcription, a finding which may lead to novel strategies for the prevention of chromatin-related pathologies.**

## INTRODUCTION

Gene expression in differentiated cells of higher eukaryotes is strongly influenced by chromatin organization (1). Heterochromatin and euchromatin, respectively, preclude and permit gene expression. Variations in chromatin organization are frequently induced by ATP-dependent chromatin remodeling (2) and histone modifying complexes (3). Transcriptionally active and transcriptionally inactive chromatin are each characterized by particular combinations of histone covalent modifications (4). For instance, hyperacetylated histone H3 and H4 (5), as well as K4 di- and tri-methylated histone H3 (6–8), are generally enriched at transcriptionally active genes, whereas histone H3 K9 (9–12) and K27 methylation (13,14) are often associated with transcriptionally restrictive chromatin.

The expression of different developmental- and tissue-specific genes is preceded by their 'potentiation' in progenitor cells. The term potentiation, also known as priming (15,16), refers to the mechanism of opening chromatin domains in progenitor cells (15–20) in order to render genes accessible to transactivators and facilitate full transcriptional activation in definitive cells (19,21–23).

Little is known about potentiation of genes subjected to abnormal epigenetic regulation. In *Drosophila*, the decision leading to gene silencing can be set before transcriptional activation and memorized until transcriptional initiation (24,25).

In mammals, it is not known whether abnormal gene silencing in differentiated cells can be influenced by epigenetic events taking place in multipotent progenitor cells. However, different investigations made in mammalian systems have brought indirect evidence suggesting that after transcriptional activation, some events characterized by abnormal epigenetic regulation are completely or partially inherited (26–29), whereas others are not (30). Abnormal epigenetic regulation can result from genomic rearrangements that relocate a gene from euchromatin to heterochromatin, thereby causing its complete or partial silencing. These phenomena are termed 'position effects'. Among the different position effects, position effect variegation (PEV) is characterized by the activity of a gene that is restricted to a subset of cells from a homozygous population. Similar to the inactivation of tumor suppressor genes in cancer, the silencing associated with PEV is randomly set and its occurrence is consistent with cell-to-cell differences in the ability of heterochromatin to invade a particular gene locus located within euchromatic regions (31).

Transgene expression is also influenced by PEV, and the human  $\beta$  (hu $\beta$ )-globin locus has been used to model epigenetic regulation in mammals (27,32–34). This locus consists of five developmentally regulated genes ( $\epsilon$ - $\gamma^G$ - $\gamma^A$ - $\delta$ - $\beta$ ). High-level globin gene expression is mediated by their direct interactions with the  $\beta$ -globin locus control region (LCR) (35–37). The hu $\beta$ -globin LCR is composed of five

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +1 5142523551; Fax: +1 5142523430; [REDACTED]

DNaseI hypersensitive sites (HS1–5) and is a major determinant of chromatin organization at the  $\beta$ -globin locus (38).

In humans (39) and in transgenic mice (27,32), human  $\beta$ -globin loci with partial LCR are susceptible to position effects. Two mouse lines with a hu $\beta$ -globin locus in which the LCR hypersensitive site 2 (HS2) is deleted ( $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C) have been characterized (27). In these lines, the ' $\Delta$ 2 locus' is integrated into pericentric heterochromatin, and the hu $\beta$ -like globin genes display a PEV pattern of expression; thus, transcription of the hu $\beta$ -globin gene is only observed in a subset of adult erythroid cells (EryC). In  $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C, PEV is associated with variations of chromatin organization in EryC and can be influenced by modifications in the concentration of chromatin-associated proteins and transcription factors (40).

We recently reported that in hematopoietic progenitor cells (HPC), the hu $\beta$ -globin locus is characterized by potent chromatin organization including gene- and developmental-specific patterns of histone covalent modifications (18). We suggested that the hu $\beta$ -like globin genes are independently potentiated before being transcribed in EryC. Here, we verified whether aberrant epigenetic regulation of globin gene expression results from disrupted potentiation in HPC. To this end, we studied epigenetic regulation of the hu $\beta$ -globin gene in the PEV line  $\Delta$ 2B or  $\Delta$ 2C and in line 2 mice (ln2), which express the globin genes normally (41). We show that the decision to variegate is set early during hematopoiesis and is inherited, with some restrictions, until final erythroid differentiation. In line with this finding, we demonstrate that important chromatin abnormalities characterize the hu $\beta$ -globin locus in  $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C HPC. Additionally, we show that transient Trichostatin A (TSA) treatment of  $\Delta$ 2B HPC can modify PEV in erythroid-derived cells, whereas TSA treatment of EryC has no effect on hu $\beta$ -globin gene expression. Altogether, our data indicate that abnormal epigenetic regulation in mammals can result from the disruption of gene potentiation in multipotent progenitor cells. Furthermore, this phenomenon is inherited during tissue differentiation and can be effectively modulated before the onset of full gene activity.

## RESULTS

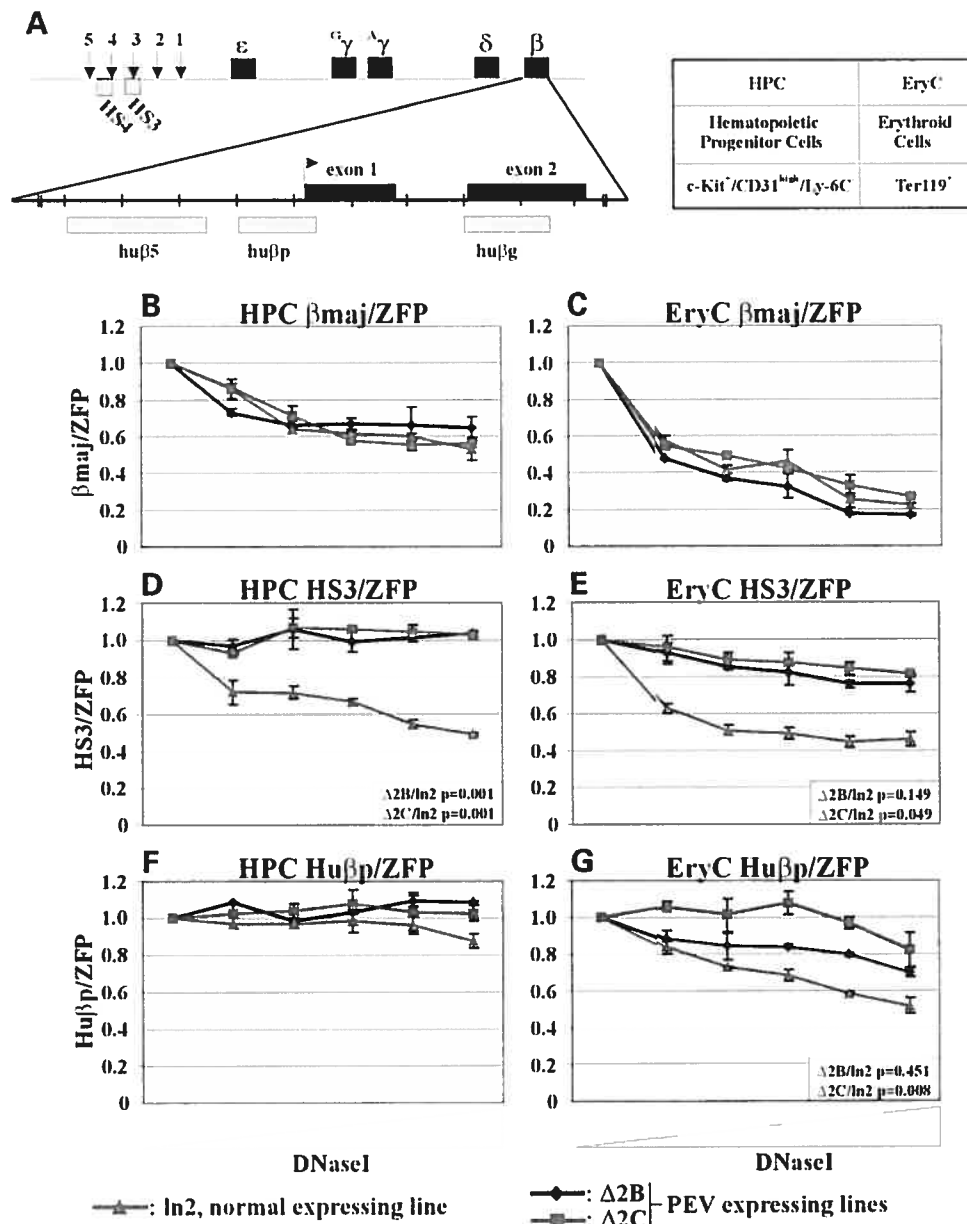
### Aberrant expression of the hu $\beta$ -globin gene in EryC correlates with the disruption of the locus chromatin organization in HPC

The hu $\beta$ -globin locus in each of ln2,  $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C is integrated into pericentric heterochromatin. However, ln2 mice express the hu $\beta$ -gene normally (41), whereas  $\Delta$ 2 lines display variegated gene expression as detected in 25% ( $\Delta$ 2B) or 4% ( $\Delta$ 2C) of transgenic EryC (27). We recently showed that the hu $\beta$ -gene and -promoter are epigenetically marked by histone H3 acetylation/K4 dimethylation (H3ac/H3-meK4) in human and in ln2 bone marrow HPC (18). These histone covalent modifications appear to be important for the potentiation of the hu $\beta$ -globin gene in bone marrow cells.

If the abnormal chromatin organization associated with PEV expression pattern results from disrupted epigenetic events occurring early during hematopoiesis, epigenetic marks that characterize the locus in ln2 HPC are likely to be altered in

$\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C HPC. Thus, chromatin organization and histone covalent modifications at the hu $\beta$ -globin locus (Fig. 1A) were analyzed in HPC and EryC purified from ln2,  $\Delta$ 2B or  $\Delta$ 2C bone marrow. Cells selected for their c-Kit<sup>+</sup>/CD31<sup>high</sup>/Ly-6C<sup>−</sup> phenotype (HPC) and Ter119<sup>+</sup> cells (EryC) were subjected to DNaseI sensitivity and chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses (18). DNaseI sensitivity and histone covalent modifications were evaluated by quantitative duplex PCR analysis. One primer set was specific for a region of the locus and another primer set was specific for genes transcriptionally inactive in hematopoietic cells, namely *ZFP37* (ZFP, Figs 1–3 and 5) or *amylase 2.1y* (data not shown, but results were the same). PCR reactions were performed under conditions of linear amplification, and the relative enrichment of globin sequences was normalized to DNaseI non-treated samples or ChIP input material (18). DNaseI sensitivity at mouse  $\beta$  major promoter ( $\beta$ maj) was analyzed in all lines and used as reference for the assay. In both HPC (Fig. 1B) and EryC (Fig. 1C),  $\beta$ maj sensitivity is similar among transgenic lines, indicating that the DNaseI digestion patterns illustrated in Figure 1 are comparable in ln2,  $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C samples. The HS3 region of the LCR was shown to be significantly more sensitive to DNaseI digestion in ln2 HPC than in PEV HPC (Fig. 1D). For all lines, HS3 sensitivity is higher in EryC than in HPC; nevertheless, HS3 accessibility is considerably lower in PEV EryC than in ln2 EryC (Fig. 1E). A similar trend is observed for the HS4 region (data not shown). The hu $\beta$ -promoter manifests little sensitivity to DNaseI in ln2 HPC (18), and DNaseI accessibility is lost in PEV HPC (Fig. 1F). As observed in fetal liver EryC (40), hu $\beta$ -promoter accessibility in bone marrow-derived EryC appears to be proportional to the number of EryC capable to transcribe the hu $\beta$ -gene (ln2 >  $\Delta$ 2B >  $\Delta$ 2C, Fig. 1G). Thus in PEV lines, chromatin 'activation' at HS3 and HS4 is affected early during hematopoiesis, suggesting that incomplete chromatin remodeling of the locus in HPC provides the basis for less efficient transcriptional activity in EryC.

ChIP analyses revealed that in HPC derived from either ln2 or PEV lines, HS3 is not significantly acetylated at histone H3 (Fig. 2A). In contrast, HS3 is significantly acetylated at histone H4 and K4 dimethylated at histone H3, but only in ln2 HPC (Fig. 2B and C). Similar results were obtained when the LCR HS4 region was analyzed (data not shown). In EryC, differences between PEV lines and ln2 are even more remarkable, as HS3 in ln2 EryC displays a higher level of H3ac, H4ac and H3-meK4 than that in  $\Delta$ 2B or  $\Delta$ 2C EryC (Fig. 2A–C). The hu $\beta$ -promoter is not significantly acetylated at histone H4 either in ln2 HPC or in PEV HPC (Fig. 2E, ratio: 1), whereas hu $\beta$ -promoter H3ac and H3-meK4 are greater in HPC purified from ln2 than that from PEV lines (Fig. 2D and F). Similarly, the hu $\beta$ -globin gene displays H3ac, H4ac and H3-meK4 exclusively in HPC purified from ln2 (Fig. 2G–I). When compared with ln2,  $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C EryC display lower levels of H3-meK4 at the hu $\beta$ -promoter (Fig. 2F) and of H3ac, H4ac and H3-meK4 at the hu $\beta$ -gene (Fig. 2G–I). Taken together, these results indicate that variegated hu $\beta$ -gene expression in  $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C EryC correlates with an abnormal pattern of chromatin organization and histone covalent modifications at the LCR (HS3 and HS4), hu $\beta$ -gene and -promoter in EryC, and, remarkably, in HPC.

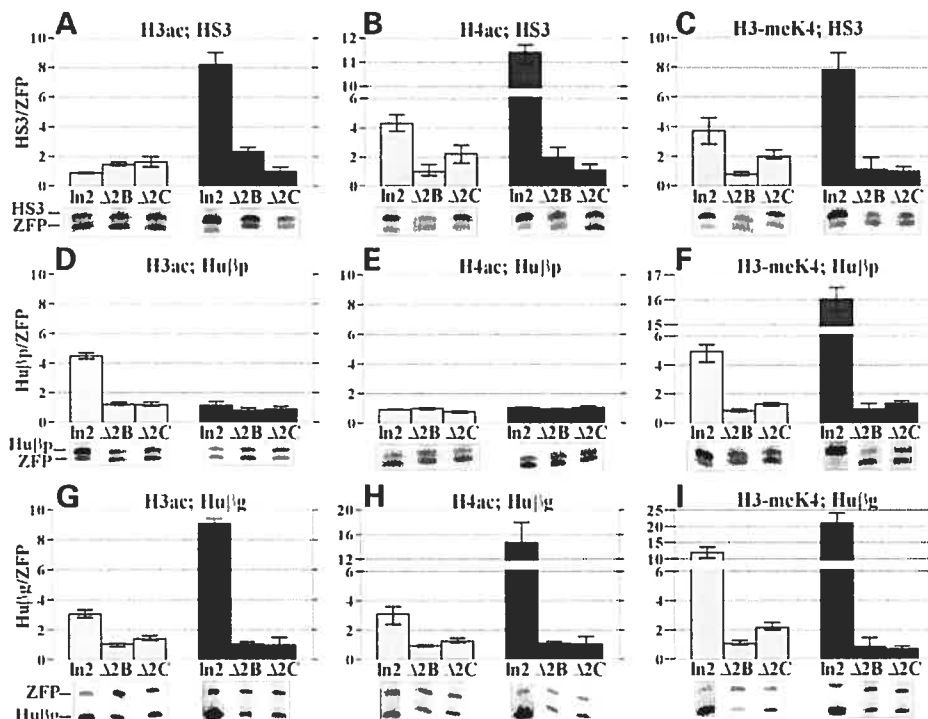


**Figure 1.** DNaseI sensitivity assay of the huβ-globin locus in ln2, Δ2B and Δ2C. (A) Map of the huβ-globin locus; genes are shown as black boxes and vertical arrows indicate location of LCR HS. Amplicons are indicated by gray boxes. An expanded view of the huβ-globin gene region illustrates in more detail the amplified regions; each segment represents 100 bp. (B–G) PCR-based DNaseI analyses. Each point of the curves represents samples of comparable molecular weight (ranging from 12 to 0.3 kb). PCR products were quantified by Phosphorimager and plotted on graphs relative to input samples (DNaseI untreated chromatin). Y-axis: relative amount of PCR products (globin/ZFP); X-axis: increasing DNaseI concentration, ranging from 0 to 0.35 U. Standard errors of mean (SEM) are indicated by vertical lines and are the results of at least three independent experiments. P-values were obtained by unpaired Student's *t*-test. ZFP: ZFP37; βmaj: β major promoter; Huβp: huβ-promoter; Huβg: huβ-gene; HPC: hematopoietic progenitor cells; EryC: erythroid cells.

#### A heritable 'silencing' mark in HPC is associated with PEV in Δ2B EryC

It has been suggested that histone methylation serves as static mark for a gene to be either expressed or repressed. In particular, K9 or K27 methylation (H3-meK9 or H3-meK27) has been linked to heterochromatic gene silencing (9–14). As mentioned earlier, HPC purified from PEV lines are

affected by a loss of histone acetylation/K4 dimethylation at HS3 and huβ-gene and -promoter, which correlates with a more compacted chromatin organization and with gene inactivation in EryC. Because the PEV pattern of huβ-gene expression appears to be linked to the disruption of chromatin potentiation, we looked for possible H3-meK9/K27 of the huβ-globin locus in Δ2B HPC. ChIP assays were performed with antibodies recognizing predominantly H3-meK9, but which



**Figure 2.** ChIP analysis of the hu $\beta$ -globin locus in ln2,  $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C. Immunoprecipitated and unbound (input) chromatin samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for hu $\beta$ -globin regions and an another primer set specific for ZFP regulatory region. All PCR reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification. Products were quantified by Phosphorimager. The level of enrichment of globin regions relative to the control and input samples is represented by bars, with their corresponding SEM deviations. A value of 1 indicates that no enrichment is detected. (A, D and G) ChIP assays with anti-acetylated histone H3 (H3ac) antibodies; (B, E and H) ChIP assays with anti-acetylated histone H4 (H4ac) antibodies; (C, F and I) ChIP assays with anti-K4 dimethylated histone H3 (H3-meK4) antibodies; Hu $\beta$ p: hu $\beta$ -promoter; Hu $\beta$ g: hu $\beta$ -gene; gray bars: HPC; black bars: EryC.

may not distinguish between dimethylated and trimethylated K9 or methylated K9 from methylated K27 (42). This analysis revealed that in  $\Delta$ 2B HPC, HS3, the hu $\beta$ -gene and -promoter, together with the region immediately upstream (hu $\beta$ 5), are 1.5–2.5-fold more H3-meK9/K27 than ZFP (Fig. 3A). Similar levels of H3-meK9/K27 are maintained in EryC (Fig. 3A). As expected, H3-meK9/K27 is not detected either at HS3 or along the hu $\beta$ -region in ln2 HPC (data not shown).

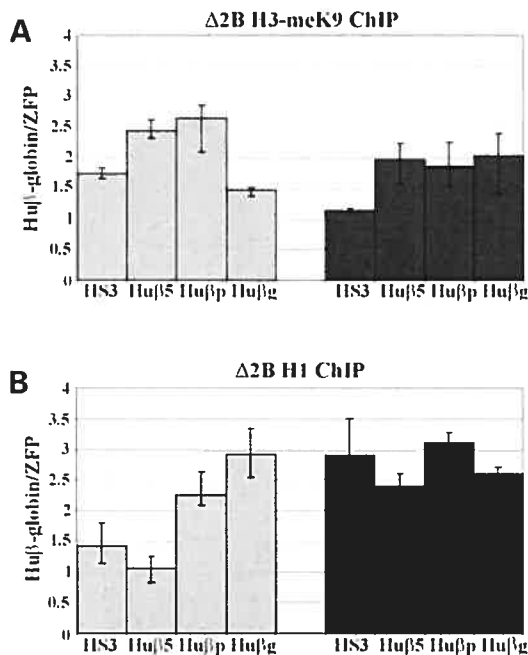
Additionally, we examined incorporation of the linker histone H1 (43) at HS3 and hu $\beta$ -region in  $\Delta$ 2B- or ln2-derived cells. Histone H1 is suggested to facilitate chromatin compaction (44). Although no H1 binding in ln2-derived cells could be detected (data not shown), we observed that H1 is enriched at the hu $\beta$ -gene and -promoter in  $\Delta$ 2B HPC, and also at hu $\beta$ 5 and HS3 in  $\Delta$ 2B EryC (Fig. 3B). These findings suggest that in  $\Delta$ 2B HPC, H3-meK9/K27 and H1 binding affect the chain of epigenetic events leading to proper chromatin activation in EryC, directing normal gene expression only on a stochastic basis in a subpopulation of cells.

#### The decision to variegate is set and inherited before full transcriptional activation

The abnormal chromatin organization of the hu $\beta$ -globin locus in  $\Delta$ 2B and  $\Delta$ 2C HPC suggests that PEV is the result

of abnormal potentiation of the locus during hematopoiesis. To characterize onset and inheritance of the abnormal chromatin organization in multipotent HPC of PEV lines, we used clonal assays in methylcellulose that permit *ex vivo* recapitulation of hematopoietic differentiation. In effect, with appropriate culture conditions, individual hematopoietic progenitors, known as colony forming units (CFUs), develop into clones that are identified as colonies. CFU-GEMM (colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte) indicates a pluripotent hematopoietic progenitor, which is capable to differentiate into erythroid and myeloid cells. Instead, BFU-E (burst forming unit-erythroid) and CFU-E (colony forming unit-erythroid) indicate, respectively, an early- or late-erythroid committed progenitor. BFU-E and CFU-E colonies are constituted exclusively by EryC.

If PEV does not follow abnormal potentiation of the hu $\beta$ -globin locus in HPC and its onset is linked to high-level transcription of the hu $\beta$ -gene in EryC, all CFU-GEMM, BFU-E and CFU-E colonies derived from  $\Delta$ 2B HPC should display the same PEV pattern of hu $\beta$ -gene expression, i.e., the same percentage of EryC per colony will express the hu $\beta$ -gene (Fig. 4A). However, if in accord with our chromatin analyses PEV results from abnormal potentiation of the locus in a subset of HPC that is inherited during hematopoiesis, the hu $\beta$ -gene will be either expressed or silenced in all EryC of each colony, giving rise to an 'all-or-none' pattern of gene



**Figure 3.** Histone H3 K9 methylation and histone H1 distribution in the PEV line Δ2B. Δ2B HPC (gray bars) or EryC (black bars) were subjected to ChIP analysis with (A) anti-K9/K27 dimethylated histone H3 (H3-meK9) or (B) anti-histone H1 (H1) antibodies. The level of enrichment of globin regions relative to the control (ZFP) and input samples is represented by bars, with their corresponding SEM deviations. A value of 1 indicates that no enrichment is detected. Huβ5: huβ-promoter 5' region; Huβp: huβ-promoter; Huβg: huβ-gene.

expression (Fig. 4B). To distinguish between these possibilities, single Δ2B colonies were analyzed by semi-quantitative RT-PCR with primers amplifying huβ and βmaj mRNAs (45), the latter being used as control for reaction efficiency and as internal reference. Huβ-gene expression was seen in 90% of CFU-GEMM (17 out of 19 tested), 70% of BFU-E (17 out of 24 tested) and 30% of CFU-E (9 out of 31 tested) colonies (exemplified in Fig. 4D). Interestingly, huβ-gene expression appears to vary significantly between individual Δ2B CFU-GEMM and BFU-E colonies. The inconsistency of huβ-gene expression suggests that the percentage of expressing cells differs from one colony to another, i.e., the individual CFU-GEMM and BFU-E possess distinct patterns of PEV expression. To better evaluate variegation patterns, huβ-gene expression in separate Δ2B BFU-E colonies was quantified by real-time RT-PCR using ln2 BFU-E colonies as reference and gapdh mRNA as internal control. We observed that in Δ2B BFU-E colonies, the huβ-gene was expressed at high (colonies 1–3), intermediate (colony 4), very low (colonies 5 and 6) or undetectable (colonies 7 and 8) levels (Fig. 4E). The aim of the real-time PCR analysis was to verify whether huβ-gene expression is identical among Δ2B BFU-E colonies (we note that ratios presented in Fig. 4E do not take into account transgene copy number: three copies in Δ2B and one copy in ln2). PEV inheritance was further examined by single-cell RT-PCR (discussed earlier) of the huβ-gene expression on individual EryC isolated from Δ2B BFU-E colonies. As exemplified in Figure 4F, in some

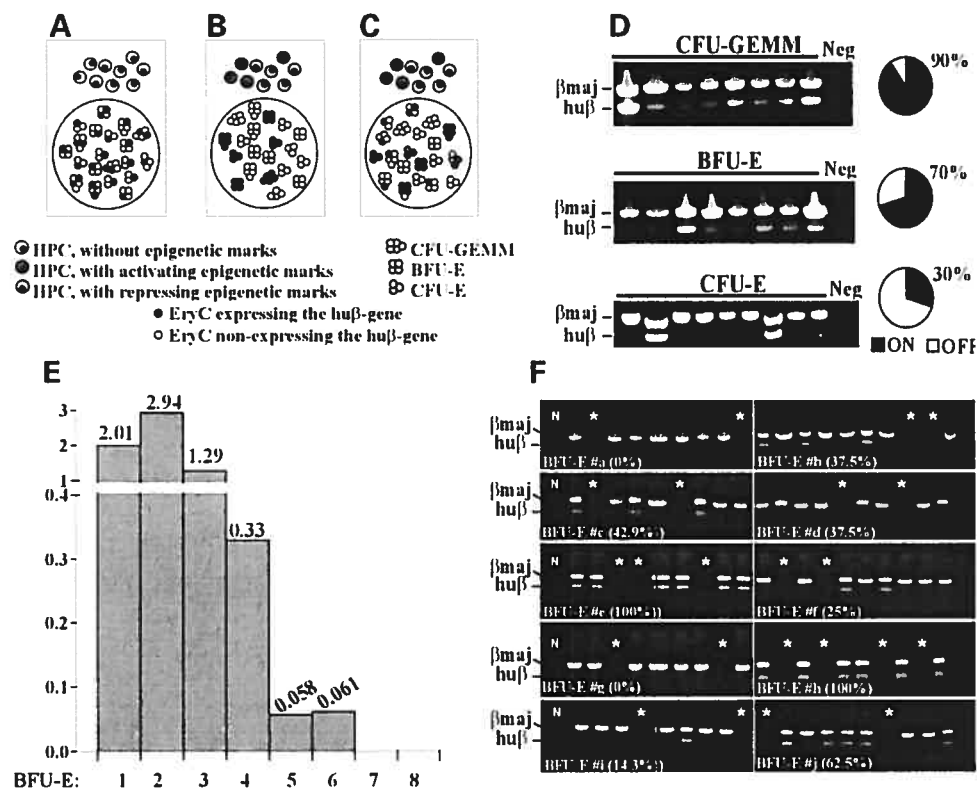
BFU-E, all EryC express the huβ-gene (e and h); whereas in others the huβ-gene is not expressed at all (a and g); finally, many BFU-E colonies (b, c, d, f, i and j) are constituted by a variable proportion of expressing, as well as non-expressing EryC. Immunofluorescence analysis of single Δ2B BFU-E colonies with anti-human hemoglobin A antibodies did corroborate the RT-PCR results (Supplementary Material, Fig. S1). Therefore, single-cell analyses confirm that the number of EryC expressing the huβ-gene is not constant among Δ2B BFU-E colonies.

PEV variability and the absence of huβ-gene expression in some CFU-GEMM and BFU-E colonies strongly suggest that (i) PEV results from abnormal potentiation of the locus in a subset of multipotent HPC prior to the CFU-GEMM stage of hematopoietic differentiation and (ii) in a restrictive chromatin context, the abnormal epigenetic marks that characterize the huβ-globin locus in early HPC are inherited during hematopoiesis, but their transmission to progeny cells is not always stable. This 'imperfect' inheritance would lead to low-frequency PEV reversion during hematopoiesis (Fig. 4C).

#### Transient TSA treatment can modify the PEV pattern of huβ-gene expression in Δ2B

We previously showed that the treatment of ln2 EryC with the histone deacetylase inhibitor TSA results in histone H3 hyperacetylation at the huβ-promoter without significantly modifying gene expression levels (18). The reduced levels of H3ac/H3-meK4 found at the huβ-globin locus in Δ2B and Δ2C HPC and EryC could, in principle, render these lines responsive to TSA. Because both PEV lines display similar defects in chromatin activation in HPC and EryC, the effect of TSA treatment was analyzed exclusively in Δ2B cells. TSA-treated Δ2B EryC were purified and subjected to ChIP analysis using a panel of antibodies specific to acetylated or methylated histone H3 or H4. In TSA-treated EryC, H3ac at HS3 and huβ-promoter significantly increases (Fig. 5A, black bars), whereas no change in H4ac is detected (Fig. 5B, black bars). As expected, TSA does not affect H3-meK4 in EryC (Fig. 5C, black bars). Using real-time RT-PCR and mouse gapdh mRNA as control (46), we observed that the huβ-gene expression is not induced when EryC are treated with TSA (Fig. 6A). These data collectively indicate that TSA treatment of Δ2B EryC induces histone H3ac at HS3 and huβ-promoter but is not sufficient to modify the huβ-globin gene expression in these cells. Similar results were previously observed in ln2 TSA-treated EryC (18).

We then asked whether TSA treatment of HPC could modify histone covalent modifications leading to variation of huβ-gene expression in EryC. For this purpose, Δ2B bone marrow cells were seeded on methylcellulose and transiently treated with TSA. Indeed, TSA, whose efficacy in culture is limited to ~20 h (47), was provided only once at the beginning of the culture. BFU-E and CFU-GEMM colonies were used for ChIP or real-time RT-PCR analysis. TSA treatment of Δ2B HPC enhances H3ac at the LCR (HS3) and huβ-gene in erythroid-derived cells (Fig. 5A, gray bars). H4ac increases at HS3 and huβ-gene but not at the huβ-promoter (Fig. 5B, gray bars), whereas the level of H3-meK4 increases at HS3 and huβ-gene, and -promoter (Fig. 5C, gray bars). Therefore,



**Figure 4.** PEV onset and inheritance. (A–C) Schematic view of the expected outcomes by clonal assays in methylcellulose. (A) PEV is set on a stochastic base in EryC (EryC). EryC-containing colonies (CFU-GEMM, BFU-E and CFU-E colonies) display the same level of huβ-gene expression, that is, the same variegation pattern. (B) PEV is set, on a stochastic base, in HPC. All EryC within CFU-GEMM, BFU-E or CFU-E colonies that originate from 'active' HPC express the huβ-gene. Conversely, all EryC within CFU-GEMM, BFU-E or CFU-E colonies that originate from 'inactive' HPC do not express the huβ-gene. (C) PEV is set, on a stochastic base, in HPC but epigenetic marks are not perfectly transmitted to the progeny. Some CFU-GEMM, BFU-E or CFU-E colonies show 'all-or-none' pattern of expression (as in B), but other colonies display different levels of huβ-gene expression, e.g., different variegation patterns, which depend on the degree of PEV reversion. (D) Representative examples of RT–PCR on single methylcellulose colonies. Single Δ2B CFU-GEMM, BFU-E or CFU-E colonies were used for one-step RT–PCR analysis, with primers amplifying both mouse βmaj (upper band) and huβ (lower band) gene transcripts (45). Each lane represents the expression pattern of one individual colony. Neg: negative control. Circle graphs indicate the proportion of colonies expressing the huβ-globin gene (black sectors). (E) Real-time PCR on single Δ2B BFU-E colonies (1–8). Values indicate ratios of huβ/gapdh transcript levels in individual BFU-E colonies. (F) Representative examples of RT–PCR analyses on single-cell purified from independent Δ2B BFU-E colonies. In parentheses are the percentages of huβ-expressing EryC/total EryC. 'N' indicates negative controls and asterisks indicate reactions that did not result in any detectable PCR products.

transient TSA treatment of Δ2B HPC induces H3ac, H4ac and indirectly H3-meK4 at the LCR (HS3) and huβ-gene in erythroid-derived cells. Real-time RT–PCR (Fig. 6A) and S1 nuclease protection assay (Fig. 6B) revealed that EryC derived from TSA-treated Δ2B HPC transcribe the huβ-gene more efficiently than ethanol-treated or fresh bone marrow derived EryC, whereas the huβ-gene expression does not increase in EryC derived from TSA-treated ln2 HPC (Fig. 6A). This important increase of the huβ-gene expression in Δ2B appears to be the consequence of higher frequency of individual huβ-globin expressing EryC. Indeed, single-cell RT–PCR performed with EryC isolated from independent Δ2B BFU-E colonies derived from TSA-treated HPC (exemplified in Fig. 6C) revealed that upon TSA treatment, almost all EryC transcribe the huβ-gene (compare Fig. 4F, no TSA, with Fig. 6C, presence of TSA).

These results not only confirm that appropriately 'poised' chromatin in HPC is necessary for correct huβ-gene transcription in EryC, but also indicates that (i) disrupted chromatin organization at the huβ-globin locus in HPC precedes

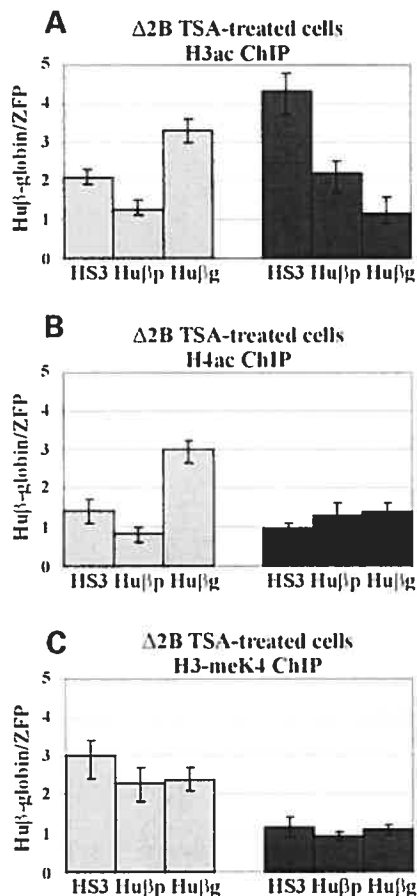
abnormal huβ-gene expression in EryC and (ii) transient TSA treatment of HPC, but not of EryC, induces a significant increase of the huβ-gene activity in Δ2B erythroid-derived cells.

## DISCUSSION

### Abnormal gene expression and chromatin organization

In this study, we have investigated the role played by chromatin in the establishment and inheritance of tissue- and developmental-specific epigenetic control of gene expression. We show that, compared with ln2, the abnormal expression pattern of the huβ-gene in Δ2B and Δ2C EryC correlates with inappropriate chromatin organization of the locus (LCR and huβ-region) in HPC and EryC, which is characterized by decreased chromatin accessibility, lack of histone acetylation/K4 dimethylation, and by increased levels of K9/K27 methylation and H1 binding. Because histone H3-meK4 can block the interaction of the histone deacetylase NuRD complex and prevent H3-meK9, which in turn inhibits H3ac



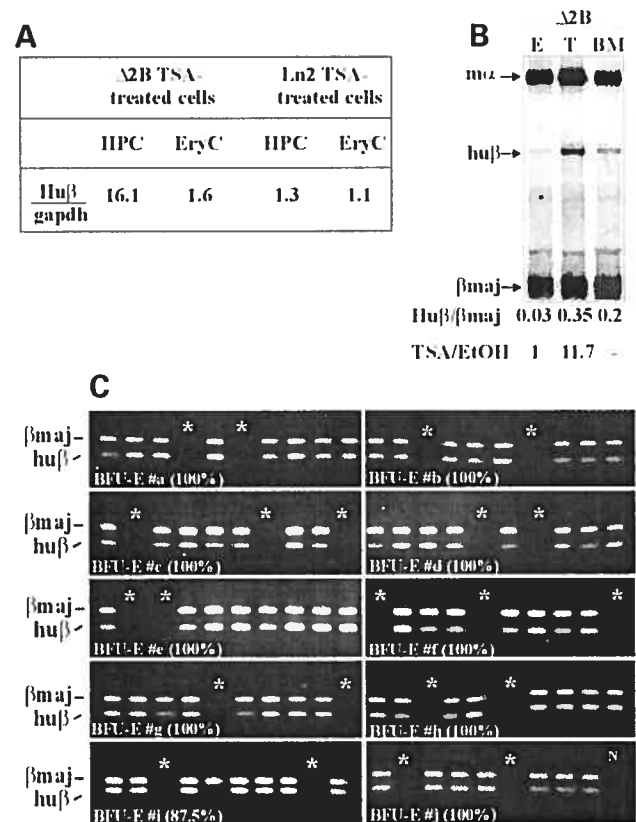


**Figure 5.** ChIP analysis of the huβ-globin locus in  $\Delta 2B$  TSA-treated cells. EryC derived from TSA-treated HPC (gray bars), as well as TSA-treated EryC (black bars), were subjected to ChIP analysis with anti-acetylated histone H3 (H3ac), H4 (H4ac) or K4 dimethylated histone H3 (H3-meK4) antibodies. Globin/ZFP ratios were normalized to input samples. The level of enrichment of TSA-treated cells is relative to the level of enrichment of ethanol (TSA solvent)-treated cells and is represented by bars with their corresponding SEM deviations. A value of 1 that indicates no enrichment in TSA-treated cells relative to their ethanol-treated controls. Huβp: huβ-promoter; Huβg: huβ-gene.

(48), the lack of H3ac/H3-meK4 observed in PEV HPC could target the huβ-promoter for H3-meK9 or similar histone covalent modifications that provide a code for the establishment/maintenance of heterochromatin (49,50). Thus, in PEV HPC the assembly of an appropriate 'activated' chromatin, necessary for correct chromatin competence during hematopoiesis is clearly impeded. Accordingly, our results provide compelling evidence that the abnormal epigenetic regulation of erythroid-specific gene (globins) expression can result from epigenetic regulation variability in progenitor cells.

#### Disruption of huβ-gene potentiation and epigenetic inheritance

Abnormal epigenetic regulation associated with silencing or variegated gene expression is frequently caused by spreading



**Figure 6.** huβ-gene expression in In2 and  $\Delta 2B$  TSA-treated cells. (A) Real-time RT-PCR analysis of In2 or  $\Delta 2B$  hematopoietic cells. Fold enrichments were obtained according to the equation depicted in Materials and Methods. They represent the outcome of two independent experiments. HPC: hematopoietic progenitor cells; EryC: erythroid cells. (B) S1 nuclease protection assay of  $\Delta 2B$  bone marrow (BM) and EryC derived from ethanol-treated (E) or TSA-treated (T)  $\Delta 2B$  HPC. Expected protected fragments are indicated on the left-hand side of the image; mα: mouse α; huβ: human β; βmaj: mouse β major. Relative huβ/βmaj ratios and fold enrichment in the TSA-treated cells relative to the ethanol-treated cells (TSA/EtOH) are indicated at the bottom of the image. (C) Representative examples of RT-PCR analyses on single-cell purified from individual  $\Delta 2B$  BFU-E colonies derived from TSA-treated HPC. In parentheses are the percentages of huβ-expressing EryC/total EryC. 'N' indicates negative control and asterisks indicate reactions that did not result in any detectable PCR products.

of heterochromatin into euchromatic regions. This can be the consequence of genomic rearrangements that juxtapose heterochromatic and euchromatic regions. Alternatively, it can result from changes in local concentrations of heterochromatic proteins, as frequently observed in chromosomal translocations that induce fusion of epigenetic factors, e.g. AML1-ETO translocation. In both situations, transcription is stochastically abolished or prevented in a subset of cells, which then confer this new epigenetic state to their progeny (24,25,51). Transgenic studies have shed some light upon how PEV and chromatin organization influence gene expression in mammals (29,40,52). However, the events leading to the onset and inheritance of disrupted chromatin organization causing an abnormal epigenetic regulation, in particular during development, differentiation and before high-level transcription, are not well understood.



Different markers of hematopoietic lineages, including the  $\text{hu}\beta$ -globin genes, are potentiated (or primed) in multipotent HPC, as well as in hematopoietic stem cells (15,17,18). In addition, some lineage-specific markers are expressed at basal level in early hematopoietic progenitors, suggesting that potentiation/priming is a common phenomenon for many hematopoietic genes (53–55). Thus, we wondered whether abnormal epigenetic regulation could be the end result of a disrupted potentiation in multipotent progenitor cells. To address these issues, we studied chromatin organization and expression profile of the  $\text{hu}\beta$ -gene during hematopoiesis by clonal assays in methylcellulose. Our data strongly support a mechanism of PEV that follows abnormal chromatin organization of the  $\text{hu}\beta$ -globin locus in multipotent HPC, which appears to be composed of a mixed population of competent HPC (active) or not competent HPC (inactive) for future  $\text{hu}\beta$ -gene expression in mature EryC. Additionally, inconsistent  $\text{hu}\beta$ -gene expression among erythroid colonies indicates that in early progenitors, abnormal epigenetic control of globin locus activation is plastic, i.e., chromatin at  $\text{hu}\beta$ -region can switch from an active to an inactive organization and vice versa (reversion) conducting, respectively, to expression or abolition of the  $\text{hu}\beta$ -gene expression in EryC. Plasticity is common during hematopoietic lineage commitment, and changes in single regulatory factor can modify cell fate (56). It is not clear which regulatory factors could influence either the epigenetic inheritance or the plasticity of the  $\text{hu}\beta$ -globin locus during hematopoiesis. The fact that 'non-expressing CFU-GEMM' colonies are less frequent than 'non-expressing BFU-E' colonies suggests that, as observed in *Drosophila* (25), reversion of variegated expression pattern is facilitated by cell division. Moreover, the all-or-none pattern of expression of the  $\text{hu}\beta$ -gene in CFU-E colonies indicates a very low frequency of reversion, which might result from the low number of cellular divisions between CFU-E progenitors and EryC.

#### TSA treatment of HPC modifies PEV

As discussed earlier, abnormal chromatin organization at the  $\text{hu}\beta$ -globin locus in HPC of  $\Delta 2\text{B}$  and  $\Delta 2\text{C}$  lines is linked to PEV in EryC. Transient TSA treatment of  $\Delta 2\text{B}$  HPC induces a remarkable increase of  $\text{hu}\beta$ -gene expression in EryC, which results from higher frequency of individual  $\text{hu}\beta$ -globin gene expressing EryC and, possibly, from full reactivation of the three  $\text{hu}\beta$  transgenes ( $\Delta 2\text{B}$  is a three-copy transgenic line) (27). It is noteworthy that TSA is chemically unstable and, in culture, its efficacy is limited to  $\sim 20$  h (47). Because TSA was provided only once at day 0 of HPC culture, it can be assumed that a single pulse of TSA early during hematopoiesis is sufficient to relieve epigenetic silencing. By favoring H3ac and indirectly H3-meK4, TSA could prevent H3-meK9/K27 and hence maintain a 'poised' chromatin state for incoming high-level gene expression, as also recently suggested at the chicken  $\beta$ -globin locus (57). The fact that TSA treatment of  $\Delta 2\text{B}$  EryC is associated with partial restoration of histone acetylation but is not sufficient to increase  $\text{hu}\beta$ -gene expression suggests that, as previously proposed (58), at this stage of hematopoietic differentiation TSA is no longer able to displace H1 or to abrogate

H3-meK9/K27. These results provide evidence that during hematopoiesis, onset and stable inheritance of aberrant chromatin organization can (i) be prerequisite for abnormal regulation of gene expression, (ii) occur independently of gene transcriptional activation, and (iii) be modified in HPC before high-level gene transcription taking place in fully differentiated cells.

An increasing number of congenital diseases (e.g. ICF syndrome, Rett syndrome and ATR-X syndrome), as well as various cancers, are associated with multiple epigenetic alterations (59). Moreover, histone deacetylase inhibitors, including TSA, are being used in clinical trials for the treatment of myelodysplastic syndromes and leukemias (60). Unfortunately, the efficacy of these inhibitors is limited because the cellular population(s) to be targeted is often unknown. We have shown that the aberrant epigenetic regulation of a developmental- and tissue-specific gene is set and inherited in multipotent progenitor cells and is efficiently reverted by a transient treatment of HPC with TSA. Altogether, these findings could stimulate the development of specific therapies aiming to treat human chromatin-related pathologies.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell sorting

Mouse  $\text{c-Kit}^+/\text{CD31}^{\text{high}}/\text{Ly-6C}^-$  cells (HPC) and  $\text{Ter119}^+$  cells (EryC) were purified and characterized as previously described (18).

### TSA treatment of bone marrow cells

TSA treatment of EryC was performed as previously described (18). For TSA treatment of HPC, mouse bone marrow was seeded on methylcellulose (M3434, StemCell Technologies); 20 nM final TSA or equal volume of ethanol (TSA solvent) was added exclusively at day 0. Colonies were harvested at day 10.

### DNaseI sensitivity and chromatin immunoprecipitation assays

DNaseI sensitivity and ChIP assays were carried out as previously described (18,40). ChIP antibodies (Upstate Biotechnology) were raised against unmodified histone H1, acetylated histone H3 (K9, K14) or H4 (K5, K8, K12, K16) and dimethylated histone H3, either on K4 or on K9. Cross-linked chromatin was sonicated to obtain fragments of 400 bp average size.

### S1 nuclease protection assay

RNA samples were prepared using Trizol (Life Technologies), and the assay was carried out essentially as previously described (41).

### Duplex PCR and RT-PCR analyses

Quantitative PCR and semi-quantitative RT-PCR analyses were performed as previously described (18,40). For single-colony

RT-PCR, mouse bone marrow was seeded on methylcellulose (M3434, StemCell Technologies) and single colonies were collected after 3 days (CFU-E) or 10 days (BFU-E and CFU-GEMM) of culture. For single-cell RT-PCR, BFU-E colonies were washed once in PBS and single cells were deposited into 96-well plates using FACS Vantage (Becton Dickinson).

### Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted by RNeasy MiniKit (Qiagen) and used for cDNA synthesis by Sensiscript RT kit (Qiagen). cDNA was used in real-time PCR (iCycler iQ™, Bio-Rad) with Qiagen QuantiTect probes specific for huβ-globin cDNA (5' primer: tcggtgccttagtgatg; 3' primer: ttgccag-gagcctgaa; TET-labeled QuantiProbe: acctttgccacactga; HuβRT) or mouse gapdh cDNA (FAM-labeled QuantiTect gene expression assay, Qiagen, GapdRT). To avoid genomic DNA contamination, HuβRT and GapdRT primers were designed to span intron-exon junctions. HuβRT and GapdRT PCR reactions were independently run at least in triplicate. The following equation (61) was used to quantify huβ relative to gapdh mRNA

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control}-\text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control}-\text{sample})}}$$

where  $E_{\text{target}}$  represents HuβRT PCR efficiency;  $E_{\text{ref}}$ , GapdRT PCR efficiency; CP, crossing point. For Δ2B BFU-E PCR:  $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$ , CP deviation of ln2-Δ2B of huβ-gene transcript;  $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ , CP deviation of ln2-Δ2B of gapdh transcript. For TSA-treated samples:  $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$ , CP deviation of ethanol-TSA of huβ-gene transcript; and  $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ , CP deviation of ethanol-TSA of gapdh transcript.

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at HMG Online.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank F. Grosveld for useful discussions and the transgenic mouse lines used in this study, and N. Dillon, E. Drobetsky, J. Ellis and G. Sauvageau for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Cancer Research Society Inc. and from the National Cancer Institute of Canada (Terry Fox Foundation) held by E.M.

### REFERENCES

- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature*, **421**, 448–453.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**, 475–487.
- Iizuka, M. and Smith, M.M. (2003) Functional consequences of histone modifications. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 154–160.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074–1080.
- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L. and Cote, J. (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.*, **19**, 321–329.
- Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T. and Schreiber, S.L. (2002) Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 8695–8700.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, **419**, 407–411.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. and Struhl, K. (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell*, **11**, 709–719.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. *et al.* (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593–599.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110–113.
- Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D. and Felsenfeld, G. (2001) Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*, **293**, 2453–2455.
- Rice, J.C., Briggs, S.D., Ueberheide, B., Barber, C.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Shinkai, Y. and Allis, C.D. (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol. Cell*, **12**, 1591–1598.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. and Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, **298**, 1039–1043.
- Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y. *et al.* (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell*, **12**, 1577–1589.
- Jimenez, G., Griffiths, S.D., Ford, A.M., Greaves, M.F. and Enver, T. (1992) Activation of the beta-globin locus control region precedes commitment to the erythroid lineage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 10618–10622.
- Delassus, S., Titley, I. and Enver, T. (1999) Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood*, **94**, 1495–1503.
- Kontarakis, J., Chen, H.H., Riggs, A. and Bonifer, C. (2000) Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: reorganization of the lysozyme locus before trans-activator binding and gene expression. *Genes Dev.*, **14**, 2106–2122.
- Bottardi, S., Aumont, A., Grosveld, F. and Milot, E. (2003) Developmental stage-specific epigenetic control of human beta-globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation. *Blood*, **102**, 3989–3997.
- Cirillo, L.A., Lin, F.R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M. and Zaret, K.S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell*, **9**, 279–289.
- Tagoh, H., Himes, R., Clarke, D., Leenen, P.J., Riggs, A.D., Hume, D. and Bonifer, C. (2002) Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells. *Genes Dev.*, **16**, 1721–1737.
- Lee, C.H., Murphy, M.R., Lee, J.S. and Chung, J.H. (1999) Targeting a SWI/SNF-related chromatin remodeling complex to the beta-globin promoter in erythroid cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 12311–12315.
- Cosma, M.P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell*, **97**, 299–311.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T. and Thanos, D. (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, **103**, 667–678.
- Cavalli, G. and Paro, R. (1999) Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science*, **286**, 955–958.

25. Ahmad, K. and Henikoff, S. (2001) Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Cell*, **104**, 839–847.
26. Festenstein, R., Tolaini, M., Corbella, P., Mamalaki, C., Parrington, J., Fox, M., Miliou, A., Jones, M. and Kioussis, D. (1996) Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science*, **271**, 1123–1125.
27. Milot, E., Strouboulis, J., Trimbom, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F. *et al.* (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell*, **87**, 105–114.
28. Morgan, H.D., Sutherland, H.G., Martin, D.I. and Whitelaw, E. (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.*, **23**, 314–318.
29. Lundgren, M., Chow, C.M., Sabbattini, P., Georgiou, A., Minaee, S. and Dillon, N. (2000) Transcription factor dosage affects changes in higher order chromatin structure associated with activation of a heterochromatic gene. *Cell*, **103**, 733–743.
30. Graubert, T.A., Hug, B.A., Wesselschmidt, R., Hsieh, C.L., Ryan, T.M., Townes, T.M. and Ley, T.J. (1998) Stochastic, stage-specific mechanisms account for the variegation of a human globin transgene. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2849–2858.
31. Karpen, G.H. (1994) Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 281–291.
32. Li, G., Lim, K.C., Engel, J.D. and Bungert, J. (1998) Individual LCR hypersensitive sites cooperate to generate an open chromatin domain spanning the human beta-globin locus. *Genes Cells*, **3**, 415–429.
33. Francastel, C., Walters, M.C., Groudine, M. and Martin, D.I. (1999) A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centrometric heterochromatin. *Cell*, **99**, 259–269.
34. Alami, R., Grealley, J.M., Tanimoto, K., Hwang, S., Feng, Y.Q., Engel, J.D., Fiering, S. and Bouhassira, E.E. (2000) Beta-globin YAC transgenes exhibit uniform expression levels but position effect variegation in mice. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 631–636.
35. Tolhuis, B., Palstra, R.J., Splinter, E., Grosveld, F. and de Laat, W. (2002) Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol. Cell*, **10**, 1453–1465.
36. Carter, D., Chakalova, L., Osborne, C.S., Dai, Y.F. and Fraser, P. (2002) Long-range chromatin regulatory interactions *in vivo*. *Nat. Genet.*, **32**, 623–626.
37. Palstra, R.J., Tolhuis, B., Splinter, E., Nijmeijer, R., Grosveld, F. and de Laat, W. (2003) The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat. Genet.*, **35**, 190–194.
38. Grosveld, F., Dillon, N. and Higgs, D. (1993) The regulation of human globin gene expression. *Baillieres Clin. Haematol.*, **6**, 31–55.
39. Forrester, W.C., Epner, E., Driscoll, M.C., Enver, T., Brice, M., Papayannopoulou, T. and Groudine, M. (1990) A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. *Genes Dev.*, **4**, 1637–1649.
40. McMorro, T., van den Wijngaard, A., Wollenschlaeger, A., van de Corput, M., Monkhurst, K., Trimbom, T., Fraser, P., van Lohuizen, M., Jenuwein, T., Djabali, M. *et al.* (2000) Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. *EMBO J.*, **19**, 4986–4996.
41. Strouboulis, J., Dillon, N. and Grosveld, F. (1992) Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev.*, **6**, 1857–1864.
42. Su, R.C., Brown, K.E., Saaber, S., Fisher, A.G., Merkenschlager, M. and Smale, S.T. (2004) Dynamic assembly of silent chromatin during thymocyte maturation. *Nat. Genet.*, **36**, 502–506.
43. Brown, D.T. (2003) Histone H1 and the dynamic regulation of chromatin function. *Biochem. Cell Biol.*, **81**, 221–227.
44. Khorasanizadeh, S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, **116**, 259–272.
45. Reik, A., Telling, A., Zitnik, G., Cimbor, D., Epner, E. and Groudine, M. (1998) The locus control region is necessary for gene expression in the human beta-globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroid cells. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 5992–6000.
46. Kosugi, H., Towatari, M., Hatano, S., Kitamura, K., Kiyoi, H., Kinoshita, T., Tanimoto, M., Murate, T., Kawashima, K., Saito, H. *et al.* (1999) Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy. *Leukemia*, **13**, 1316–1324.
47. Travers, H., Spotswood, H.T., Moss, P.A. and Turner, B.M. (2002) Human CD34+ hematopoietic progenitor cells hyperacetylate core histones in response to sodium butyrate, but not trichostatin A. *Exp. Cell Res.*, **280**, 149–158.
48. Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P. and Zhang, Y. (2001) Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell*, **8**, 1207–1217.
49. Peters, A.H., Mermoud, J.E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N. and Jenuwein, T. (2002) Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat. Genet.*, **30**, 77–80.
50. Boggs, B.A., Cheung, P., Heard, E., Spector, D.L., Chinault, A.C. and Allis, C.D. (2002) Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat. Genet.*, **30**, 73–76.
51. Lu, B.Y., Ma, J. and Eissenberg, J.C. (1998) Developmental regulation of heterochromatin-mediated gene silencing in *Drosophila*. *Development*, **125**, 2223–2234.
52. Festenstein, R., Sharghi-Namini, S., Fox, M., Roderick, K., Tolaini, M., Norton, T., Saveliev, A., Kioussis, D. and Singh, P. (1999) Heterochromatin protein 1 modifies mammalian PEV in a dose- and chromosomal-context-dependent manner. *Nat. Genet.*, **23**, 457–461.
53. Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C. and Enver, T. (1997) Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.*, **11**, 774–785.
54. Ye, M., Iwasaki, H., Laiosa, C.V., Stadtfeld, M., Xie, H., Heck, S., Clausen, B., Akashi, K. and Graf, T. (2003) Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term, multilineage repopulation potential. *Immunity*, **19**, 689–699.
55. Orkin, S.H. (2003) Priming the hematopoietic pump. *Immunity*, **19**, 633–634.
56. Heavey, B., Charalambous, C., Cobaleda, C. and Busslinger, M. (2003) Myeloid lineage switch of Pax5 mutant but not wild-type B cell progenitors by C/EBPalpha and GATA factors. *EMBO J.*, **22**, 3887–3897.
57. Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C. and Kouzarides, T. (2004) Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 73–77.
58. Pannell, D., Osborne, C.S., Yao, S., Sukonnik, T., Pasceri, P., Karaiskakis, A., Okano, M., Li, E., Lipshitz, H.D. and Ellis, J. (2000) Retrovirus vector silencing is *de novo* methylase independent and marked by a repressive histone code. *EMBO J.*, **19**, 5884–5894.
59. Bickmore, W.A. and van der Maarel, S.M. (2003) Perturbations of chromatin structure in human genetic disease: recent advances. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, R207–R213.
60. Claus, R. and Lubbert, M. (2003) Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene*, **22**, 6489–6496.
61. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.

